



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
BIOMEDICHE**

Direttore della Scuola: Prof.ssa Franca Deriu
INDIRIZZO IN NEUROSCIENZE

Responsabile di Indirizzo: Prof.ssa Maria Speranza Desole

XXVI CICLO

***Effetti della neurotossina MPTP e protezione da parte della
pargilina sui metaboliti energetici extracellulari e sui livelli di
dopamina nello striato in ratti “freely moving”***

Direttore:

Prof.ssa Franca Deriu

Tutor:

Prof. Pier Andrea Serra

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Maria Domenica Alvau

Anno Accademico 2012 – 2013

Dott.ssa Maria Domenica Alvau - Effetti della neurotossina MPTP e protezione da parte della pargilina sui metaboliti energetici extracellulari e sui livelli di dopamina nello striato in ratti “freely moving”. -Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Indirizzo Neuroscienze -XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Dott.ssa Maria Domenica Alvau - Effetti della neurotossina MPTP e protezione da parte della pargilina sui metaboliti energetici extracellulari e sui livelli di dopamina nello striato in ratti "freely moving". -Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Indirizzo Neuroscienze -XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

1.	<i>Introduzione</i>	3
1.1	Il morbo di Parkinson	4
1.2	Dopamina e sinapsi dopaminergica	7
1.3	Eziopatogenesi del morbo di Parkinson	11
	1.3.1 <i>Fattori ambientali</i>	11
	<i>Metalli pesanti</i>	11
	<i>Rotenone</i>	12
	<i>Paraquat</i>	13
	<i>MPTP</i>	13
	1.3.2 <i>Fattori genetici</i>	14
	α -sinucleina (<i>PARK1, PARK4</i>)	14
	<i>Parkina (PARK2)</i>	15
	<i>PINK-1 (PTEN phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1 o PARK6)</i>	15
	<i>LRRK2</i>	16
	<i>DJ-1 (PARK7)</i>	16
1.4	Modelli Sperimentali in vivo di Parkinson	17
	1.4.1 <i>Modelli farmacologici</i>	17
	<i>6-idrossidopamina</i>	17
	<i>Rotenone</i>	18
	<i>MPTP</i>	18
	1.4.2 <i>Modelli transgenici</i>	21
1.5	La pargilina	22
1.6	Metabolismo Cerebrale	23
1.7	Mitocondrio	28
1.8	Ossigeno	30
1.9	Glucosio	30
1.10	Lattato	30
1.11	ATP	31
1.12	Strumenti per lo studio del metabolismo cerebrale	32
	<i>La Microdialisi</i>	32
	<i>Microsensori e Biosensori</i>	34
2	<i>Scopo della Ricerca</i>	36
3	<i>Materiali e Metodi</i>	38
3.1	Reagenti	39
3.2	Animali	41
3.3	Chirurgia stereotassica	41
3.4	Trattamento con MPTP	43
3.5	Trattamento con pargilina	43
3.6	Trattamento con D-amfetamina	44
3.7	Doppia sonda microdialitica	45
	<i>Procedura microdialitica</i>	46
3.8	Analisi dei campioni di microdializzato	47
	<i>Analisi cromatografica</i>	47
	<i>Analisi spettrofotometrica</i>	47
3.9	Biosensore per il glucosio	49

3.10	Biosensore per il lattato.....	50
3.11	Microsensore per l'ossigeno	51
3.12	Sensore di movimento.....	54
3.13	Il Sistema Telemetrico	55
	<i>Firmware e software</i>	59
3.14	Istologia.....	63
3.15	Analisi statistica	63
3.16	Biosensore per l'ATP	65
3.17	Biosensore per MAO B.....	67
4	<i>Risultati</i>	68
4.1	L'MPTP produce dei cambi nei livelli basali striatali di DA e DOPAC con o senza pre-trattamento con pargilina	69
4.2	Effetti della somministrazione di MPTP sui livelli basali nello striato di glucosio, lattato e piruvato con e senza pre-trattamento con pargilina	72
4.3	Effetti della somministrazione sistemica di MPTP con o senza pre-trattamento con pargilina sui rapporti L/P e L/G	78
4.4	Analisi immunoistochimica della tirosina idrossilasi (TH)	82
4.5	Prove elettroniche e di calibrature del biosensore in vitro.....	83
4.6	Effetti di stimoli fisiologici e farmacologici sul glucosio e lattato striatale e sul movimento.....	85
4.7	Effetti dello stimolo fisiologico sull'ossigeno striatale.....	88
4.8	Effetto dell'MPTP sul glucosio, lattato e ossigeno striatale	89
4.9	Biosensore per l'ATP	91
4.10	Biosensore per MAO B.....	92
5	<i>Discussione e Conclusioni</i>	93
	Ottimizzazione sistema telemetrico	100
	Biosensore per l'ATP	102
	Biosensore MAO B	103
	Conclusioni	105
6	<i>Riassunto</i>	106
7	<i>Bibliografia</i>	109

1. Introduzione

1.1 Il morbo di Parkinson

Il morbo di Parkinson, detto anche “paralisi agitante”, fu descritto per la prima volta nel 1817 dal medico inglese James Parkinson nel suo *Essay on the Shaking Palsy* (London: Sherwood, Neely and Jones, 1817). La descrizione che ne fece Parkinson rimane ancora efficace per la sua capacità di metterne in risalto le alterazioni caratteristiche della postura e del movimento: “*Moto tremolante involontario, con forza muscolare ridotta, di parti non in azione, anche quando sono sorrette; con propensione a piegare il corpo in avanti e passare da un’andatura al passo alla corsa; assenza di alterazioni sensitive e dell’intelletto.*” (Kandel et al.; 2007).

Qualche anno più tardi Charcot notò altri aspetti correlati alla malattia, tra cui disfunzioni al sistema nervoso autonomo.

Nel 1893 fu scoperta l’associazione tra la *Substantia Nigra* (SN) e la malattia di Parkinson (MP); ma solo nella seconda metà del ventesimo secolo Carlson dimostrò che 80% della dopamina (DA) è presente nei nuclei della base, e in seguito a questa scoperta Hornykiewicz dimostrò la mancanza del neurotrasmettitore, in pazienti affetti da Parkinson. Intorno al 1960 furono comprese quali erano le caratteristiche neuropatologiche e neurochimiche peculiari della malattia (Kandel et al.; 2007).

La MP, è stata la prima patologia provocata dalla carenza di un solo neurotrasmettitore a essere identificata. Adesso è la più comune affezione del sistema extrapiramidale ed è la seconda tra i disordini neurodegenerativi progressivi dopo il morbo di Alzheimer. La MP è diffusa in tutto il mondo, colpisce tutti i gruppi etnici, è generalmente diagnosticata dopo i sessanta anni, con una veramente piccola preponderanza nel sesso maschile: colpisce le capacità motorie, causando disfunzioni come una rilevante difficoltà a iniziare i movimenti, detta acinesia, una riduzione dell’ampiezza e della velocità dei movimenti detta bradicinesia, e poiché i movimenti sono impoveriti, si ha la comparsa dell’ipocinesia (Martin; 2005). Il tremore a riposo, la rigidità muscolare e l’instabilità posturale sono altri sintomi peculiari della MP, ma può anche influenzare l’umore, il linguaggio e lo stato di cognizione del paziente. Generalmente è una malattia sporadica, per cui si manifesta con casi isolati a causa ignota, può essere causata da mutazioni in geni diversi, da fattori ambientali, da incidenti o da altre cause molto rare.

Talvolta può avere esordio precoce (tra i 20 e i 50 anni), o tardivo (dopo i 60 anni), con leggere differenze nei sintomi e nella patologia.

La malattia comporta la perdita di neuroni dopaminergici nella *pars compacta* della SN (SNpc), nel mesencefalo dorsale e in altri nuclei pigmentati del tronco encefalico (come il *Locus Coeruleus*) talvolta con la presenza d'inclusioni intracitoplasmatiche chiamate corpi di Lewy, che consistono in accumuli di alfa sinucleina e ubiquitina (Emborg M; 2007).

I sintomi clinici nella malattia di Parkinson si manifestano quando circa il 70 % dei neuroni dopaminergici sono già compromessi, determinando nel sistema nigrostriatale una carenza di dopamina pari a circa l'80%.

Le alterazioni che sono alla base della MP producono, oltre ad una diminuzione dell'innervazione dopaminergica, anche un'augmentata stimolazione colinergica. Lo squilibrio tra i due sistemi neurotrasmettitoriali è importante nella malattia, anche se il ruolo della dopamina è chiaramente centrale (Aguggini et al., 1992; Nicholson et al., 2002).

A oggi non esiste una cura capace di rimettere totalmente la malattia, ma sono disponibili molte strategie terapeutiche mirate a limitarne i sintomi. Poiché la DA non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, la terapia farmacologica del MP si basa principalmente sulla somministrazione di L-3,4,-diidrossifenilalanina (levodopa, L-DOPA), il precursore metabolico della dopamina (Serra et al., 2008) per aumentare la dose disponibile e ridurre gli effetti, dati dalla carenza di dopamina. Questa, somministrata oralmente, in associazione a un inibitore periferico delle decarbossilasi (la carbidopa o la benserazide), è rapidamente assorbita dall'intestino tenue, e una volta raggiunto lo SNC è convertito dall'enzima L-DOPA-decarbossilasi, in DA (Martinez- Morales and Liste; 2012).

La somministrazione dei precursori della dopamina, come la L-DOPA, però non elimina la patologia. I migliori risultati nel trattamento del MP con la levodopa si ottengono nei primi anni di terapia in cui i processi neurodegenerativi sono rallentati. Con il progredire della malattia si manifestano, con frequenza sempre maggiore, alcune fluttuazioni nella risposta clinica alla L-DOPA. Alternative farmaceutiche alla L-DOPA vi sono gli agonisti diretti dei recettori dopaminergici striatali come il

Ropinirolo e il Pramipexolo e inibitori del catabolismo della dopamina inibitori delle MAO (IMAO) quali la selegilina e la pargilina.

Il beneficio del trattamento però diminuisce nel tempo per aggravamento della malattia, dovuto alla comparsa dei fenomeni di down regulation dei recettori della DA, imposto dalla continua stimolazione da parte del farmaco e all'associata necessità di ridurre le dosi di farmaco a causa della comparsa di effetti collaterali.

1.2 Dopamina e sinapsi dopaminergica

La DA è un'ammina biogena sintetizzata naturalmente dal corpo umano Fig. 1, è un neurotrasmettitore coinvolto in numerosi sistemi neuronali tra cui le funzioni cognitive (O'Neill et al.; 2005), i circuiti di ricompensa (Wightman and Robinson; 2002) e nel controllo motorio. E' prodotta in diverse aree del cervello, tra cui la SN e l'Area Tegmentale Ventrale (VTA). Si hanno grandi quantità nei gangli della base, soprattutto nel telencefalo, nell'*accumbens*, nel tubercolo olfattorio, nel nucleo centrale dell'amigdala, nell'eminenza mediana e in alcune zone della corteccia frontale.

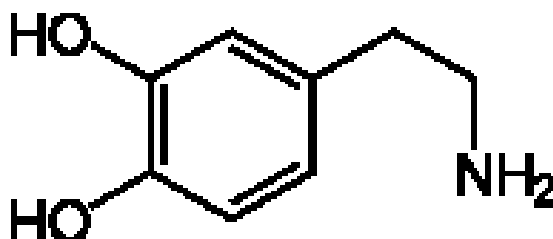


Figura 1: Dopamina

All'interno dello SNC la dopamina attiva recettori specifici accoppiati a proteine-G e al secondo messaggero cAMP, suddivisi in due famiglie D1 e D2 che a loro volta si suddividono in sottoclassi.

Nella famiglia dei D1 abbiamo recettori i D1 e D5, che sono associati positivamente al cAMP quindi la loro attivazione porta a un incremento del secondo messaggero. La famiglia dei D2 ha al suo interno i sottogruppi D2, D3 e i D4 che sono negativamente accoppiati all'adenilato ciclasi.

Biosintetizzata a partire dall'idrossilazione del amminoacido L-tirosina che viene idrossilato a L-dopa. La successiva decarbossilazione operata dalla decarbossilasi degli amminoacidi L-aromatici porta alla dopamina . Successivi passaggi biosintetici portano prima alla norepinefrina (noradrenalina) e poi all'epinefrina (adrenalina) Fig.2.

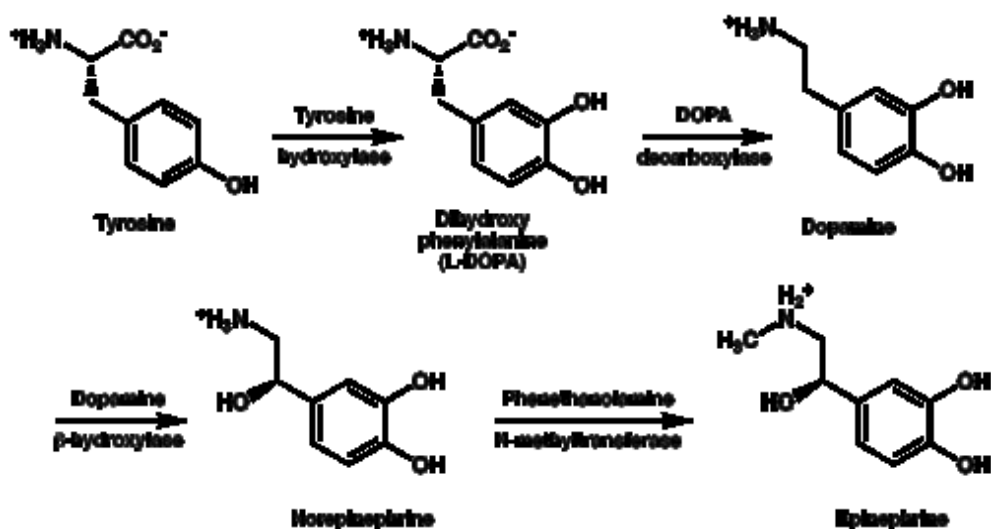


Figura 2: Biosintesi della dopamina

Una volta sintetizzata è immagazzinata all'interno delle vescicole con un processo energia dipendente pronte all'esocitosi che avviene con un meccanismo calcio-dipendente in condizioni fisiologiche Fig.3.

La dopamina viene rilasciata a livello centrale dalla SN e la sua azione è mirata a modulare l'attività inibitoria dei neuroni GABAergici.

Una volta rilasciata nello spazio sinaptico la DA viene rapidamente ricaptata in parte dall'elemento presinaptico da cui è stata liberata e viene degradata velocemente attraverso due principali diversi meccanismi: il primo meccanismo è una deaminazione a opera dall'enzima monoammino ossidasi (MAO) che forma 3,4-diidrossi-fenil-acetaldeide (DHPA), poi in seguito trasformata per opera di un'aldeide deidrogenasi in acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC). Successivamente il DOPAC viene liberato nello spazio sinaptico e trasformato in acido omovanillico (HVA) mediante una doppia conversione enzimatica operata dalla catecol-O-metiltrasferasi (COMT).

Il secondo meccanismo porta la metilazione in posizione 3 dell'anello benzenico a per mezzo della COMT e trasformata in 3 metossitiramina, (3MT).

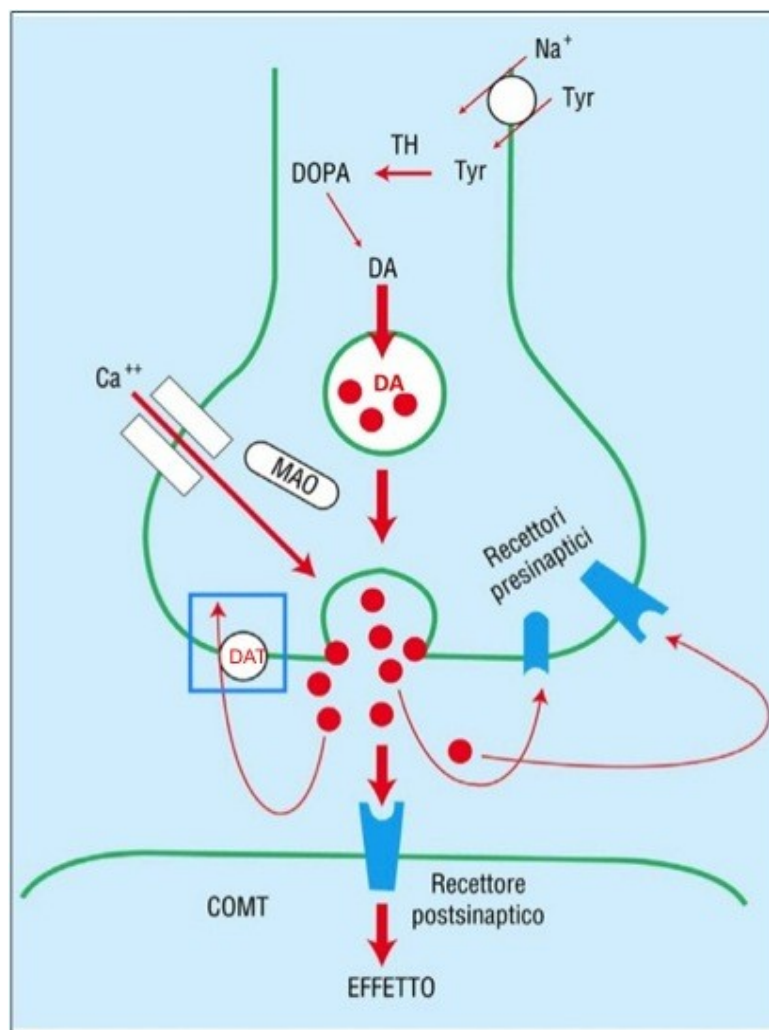


Figura 3: Sinapsi Dopaminergica

Questa viene poi riportata nell'elemento sinaptico e deaminata dalla MAO in 3-metossi-4-idrossi-fenilacetaldeide (3MHPA), la quale viene trasformata dall'aldeide deidrogenasi in HVA.

Le cellule dopaminergiche si organizzano in gruppi cellulari da cui originano sistemi di proiezione che modulano differenti circuiti. Il sistema più importante è quello mesencefalico, il Sistema Nigro-Striatale Fig.4, implicato nella malattia di Parkinson, in cui i corpi cellulari dopaminergici costituiscono la pars compacta della Substantia Nigra, e gli assoni proiettano allo Striato.

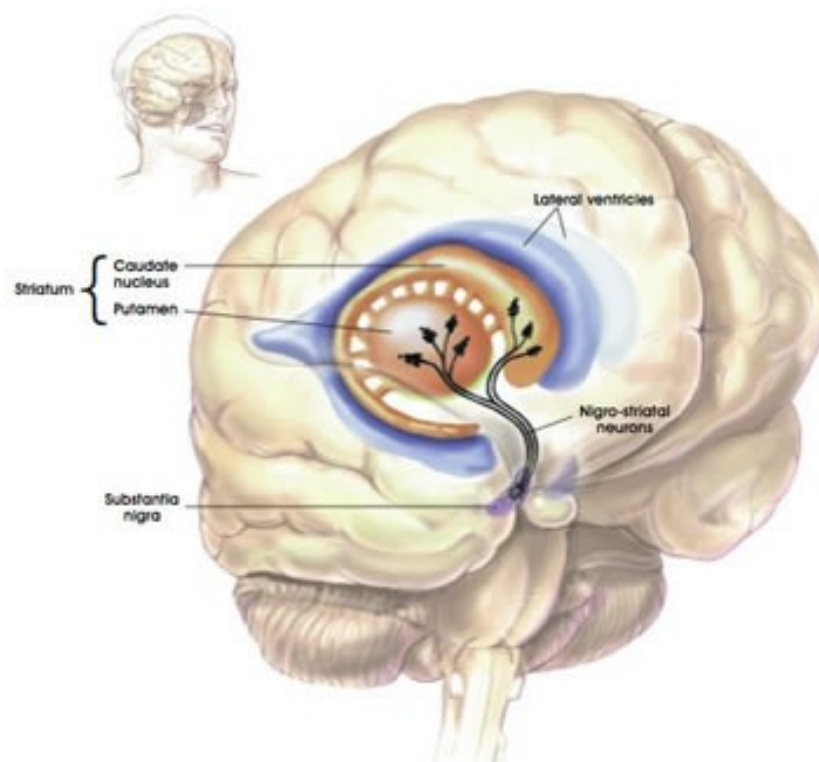


Figura 4: Sistema Nigro-Striatale

1.3 Eziopatogenesi del morbo di Parkinson

E'una malattia multifattoriale. Sebbene il fattore che causa MP sia ancora sconosciuto, diversi fattori eziologici intervengono nell'insorgenza della patologia; tra questi alcuni correlati all'ambiente in cui un soggetto vive e altri alla predisposizione genetica dell'individuo. In generale l'eziologia può esser determinata da:

- Fattori ambientali, che forniscono un quadro patologico che rientra nel Parkinson sporadico;
- Fattori genetici, che forniscono un quadro patologico che rientra nel Parkinson genetico o familiare.

Studi sui modelli di Parkinson riconducono la patogenesi della malattia a fenomeni molto frequenti quali: "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress": disfunzione mitocondriale e stress ossidativo e "Misfolding and Aggregation of Proteins": mal ripiegamento e unione delle proteine.

1.3.1 Fattori ambientali

L'esposizione prolungata a fattori tossici, presenti nell'ambiente fa sì che i sistemi di riparazione del danno a livello cellulare non siano sufficienti a contrastare gli effetti che portano a instaurare un danno permanente. In molte circostanze si manifestano senza cause evidenti, e si pensa che il MP insorga come risultato di una complessa interazione tra fattori ambientali e predisposizione genetica. Il contatto con sostanze come metalli di transizione, rotenone, paraquat, 6-idrossidopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) sono tra le principali cause dell'insorgenza del parkinsonismo sporadico.

Metalli pesanti

I metalli pesanti che possono causare l'insorgenza della malattia sono diversi tra cui il manganese (Mn); benché per il metabolismo energetico sia un metallo essenziale e sia un cofattore per diversi enzimi, un suo accumulo nell'organismo, dovuto all'esposizione cronica (da 6 mesi a 2 anni), porta a danno degenerativo permanente nel sistema Nigro-Striatale con la conseguente diminuzione della dopamina striatale.

Il Mn, come tale stimola l'autossidazione della dopamina presente nei neuroni dopaminergici, accompagnato dall'incremento della formazione delle specie reattive dell'ossigeno e dei chinoni (Desole et al.; 1996; Desole et al.; 1997; Benedetto et al. 2009; Aschner et al.; 2009). Esperimenti in vitro condotti su cellule di feocromocitoma di ratto (PC12) in grado di produrre e secernere grandi quantità di dopamina, hanno, inoltre, dimostrato che il Mn porta all'apoptosi indotta da stress ossidativo (Serra et al; 2000).

Rotenone

È estratto da piante tropicali, è un composto citotossico, appartenente alla famiglia dei rotenoidi utilizzato principalmente come insetticida e o pesticida. E' un composto lipofilo attraversa facilmente la barriera emato-encefalica (BEE) e il doppio strato lipidico immagazzinandosi negli organelli cellulari, compresi i mitocondri, causando morti cellulari (Drechsel and Patel; 2008; Miller et al.; 2009). Differenti studi hanno reso evidente che in pazienti affetti da MP sporadico non familiare, è presente una riduzione del 15-30% dell'attività del complesso I; questo a dimostrazione del fatto che la catena respiratoria svolga un ruolo nell'insorgenza della malattia e nella perdita di circa il 30% dei neuroni dopaminergici. Sviluppa un'azione tossica legandosi al complesso I e II della catena respiratoria dove riduce il flusso di elettroni causando una ridotta produzione di ATP e la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Arif and Khan; 2011; Miller et al. 2009). Altri effetti tossici sono l'accumulo di tubulina in forma di monomero con l'inibizione della formazione dei microtubuli che è dannosa per la cellula, la comparsa d'inclusioni simili ai corpi di Lewy costituiti da α -sinucleina, la progressiva deplezione di glutatione (GSH), danno ossidativo a carico delle proteine e del DNA, con conseguente morte cellulare per apoptosi (Drechsel and Patel.; 2008; Greenamyre et al.; 2001; Marshall and Himes; 1978).

Paraquat

Nasce come diserbante utilizzato in agricoltura si è visto essere una molecola molto tossica. La sua tossicità è esplicata per la formazione dello ione superossido (O_2^-) e altre specie reattive dell'ossigeno (ROS) capaci di portare a morte cellulare perché produce stress ossidativo all'interno delle cellule. Non essendo lipofilo non diffonde facilmente attraverso la BEE ma dosi elevate di questa molecola provocano imminenti danni cerebrali, com'è stato osservato in persone decedute in seguito ad intossicazione da paraquat (Day et al.; 1999).

MPTP

E' un analogo della meperidina, noto come 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP) è un composto secondario che si forma durante la sintesi dell'1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine (MPPP). Avendo una natura lipofila attraversa facilmente la barriera emato-encefalica, dove raggiunge le cellule gliali in cui è convertito nel metabolita tossico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+) dalle monoaminossidasi di tipo B (MAO B) (Drechsel and Patel .; 2008; Desole et al.; 1997). Il MPP^+ , ha la capacità di alterare il processo della fosforilazione ossidativa nei mitocondri danneggiando in modo irreversibile i complessi della catena respiratoria determinando, non solo il blocco del flusso elettronico e un ammanco della produzione di ATP, ma favorisce l'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). In entrambi i casi si ha morte cellulare (Przedborski S. et al.; 2000). E' stato osservato che è capace di accumularsi a livello della matrice mitocondriale e qui interagire con la NADH deidrogenasi, ostacolando il passaggio degli elettroni prodotti dall'ossidazione del NADH attraverso il complesso I (Arif and Khan;2011).

1.3.2 Fattori genetici

Negli ultimi anni è stato possibile comprendere i meccanismi alla base del MP con un approccio genetico molecolare in cui è stato visto che i fattori genetici giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo di tale malattia. Originariamente, sono state identificate alcune rare forme con trasmissione di tipo mendeliana del Morbo di Parkinson una in una forma a trasmissione autosomica dominante (α -sinucleina) e in una forma recessiva (parkina). Sono state scoperte in questi ultimi anni altre numerose alterazioni a carico dei geni DJ-1, LRRK2 e PINK-1. Da questi geni derivano alcune proteine che fanno parte del sistema di degradazione proteosoma-ubiquitina (UPS) deputato alla degradazione delle proteine danneggiate, mutate o mal ripiegate quando la cellula lavora in condizioni fisiologiche. Una mutazione genica comporta una compromissione del sistema, che causa l'incapacità dello stesso di rimuovere le proteine anomale con conseguente accumulo delle stesse che, aggregandosi, formano delle inclusioni insolubili dette corpi di Lewy (McNaught and Olanow ;2003) il cui costituente principale è appunto l' α -sinucleina.

α -sinucleina (PARK1, PARK4)

Il gene per l' α -sinucleina codifica per una piccola proteina (14 KDa) costituita da 140 amminoacidi; membro della famiglia delle sinucleine che include la β -sinucleina, la γ -sinucleina e la sinoretina. E' composta nella sua struttura da una regione N-terminale ad alfa eliche anfipatica implicate nell'interazione con prodotti lipidici, una regione centrale idrofobica contenente un dominio non-amiloide- β e una regione C-terminale acida (Lee and Liu.; 2008). È localizzata nelle vescicole e nelle strutture membranose dell'elemento presinaptico. A causa di tre mutazioni missenso (mutazioni puntiformi che danno origine a un codone codificante per un diverso aminoacido) individuate nel suo gene (A53T, A30P, ed E46K), e la triplicazione del gene stesso, sono associati con la manifestazione del MP con trasmissione autosomica dominante (Thomas et al.; 2007).

Parkina (PARK2)

Nel 50% dei casi di parkinsonismo a esordio giovanile a trasmissione autosomica recessiva e nel 10-15% dei casi sporadici è coinvolta la parkina (Valente et al.; 2007). Trovata nei mitocondri delle cellule proliferanti, influenza positivamente la biogenesi mitocondriale. E' una proteina di 465 amminoacidi con funzione di ubiquitina ligasi, coinvolta nelle funzioni mitocondriali, nei processi ossidativi e anche nel meccanismo del sistema ubiquitina-proteasoma. Diversi articoli dimostrano, poi, che modula l'espressione di proteine coinvolte nella regolazione del metabolismo energetico e nello stress ossidativo. Difatti, modelli sperimentali animali che non hanno la parkina, o la esprimono in forma mutata, mostrano disfunzioni mitocondriali e alterazioni nei processi ossidativi; invece, una sovra espressione della proteina riduce la capacità difensiva dei neuroni dopaminergici esposti a sostanze quali l'MPTP. In modelli cellulari, invece, si è visto che una sovra espressione della parkina impedisce che i mitocondri rilascino il citocromo C con l'attivazione della caspasi 3, incrementando l'accumulo di delle specie reattive portando a morte cellulare (Malkus et al.; 2009).

PINK-1 (PTEN phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1 o PARK6)

Costituita da una catena di 581 amminoacidi, per la presenza nella porzione N-terminale una sequenza specifica capace di interagire con i mitocondri; un dominio protein-chinasico molto conservato, appartenente alla famiglia delle calmoduline Ca^{2+} -dipendenti. PINK-1 interviene negli episodi di stress cellulare, evitando il malfunzionamento dei mitocondri. Mutazioni a carico del suo gene causano un aumento della perossidazione lipidica, mancanza dell'attività del complesso I e anche alterazioni della morfologia dei mitocondri stessi. In modelli sperimentali quando si è carenti di PINK-1 si ha un aumento dei markers tipici dello stress ossidativo e un aumento dei fenomeni apoptotici (Thomas et al.; 2007; Malkus et al.; 2009).

LRRK2

Nel 2004, sono state identificate, alcune mutazioni associate al Morbo di Parkinson nel gene LRRK2, che codifica per la proteina chinasi dardarina (LRRK2) di 2525 amminoacidi. La dardarina è prevalentemente citoplasmatica, anche se evidenze sperimentali dimostrano essere associata alla membrana esterna dei mitocondri. Sebbene la sua funzione non sia completamente nota si pensa a una sua possibile interazione con strutture cellulari coinvolte nel traffico vescicolare e nel trasporto di membrana.

DJ-1 (PARK7)

E' una proteina di 189 amminoacidi, responsabile di MP a trasmissione recessiva, sebbene la frequenza di presentare mutazioni nel gene, sia inferiore all'1% nei pazienti con esordio precoce (Valente et al.; 2007; Thomas et al.; 2007), rappresenta la causa più rara. DJ-1 stata vista e localizzata in parte nella matrice mitocondriale e negli spazi intermembranari, ma anche a livello del citosol (Dodson and Guo; 2007). Questa localizzazione mitocondriale rimanda a un suo ruolo nelle funzioni mitocondriali. Sembra, infatti, che DJ-1 abbia funzione neuroprotettiva in associazione con la parkina (Thomas et al.; 2007), di scavenger delle specie reattive dell'ossigeno, di chaperone redox-dipendente che inibisce l'aggregazione dell' α -sinucleina e quindi impedisce la morte cellulare.

1.4 Modelli Sperimentali in vivo di Parkinson

E'importante per la comprensione della patogenesi della MP, la riproduzione biochimica, morfologica e fisiologica delle sue caratteristiche in modelli animali. Il modello animale deve essere in grado di ricalcare i diversi aspetti che si osservano nella patologia umana.

Si possono riconoscere due categorie di modelli animali: uno di tipo farmacologico e l'altro transgenico. In un modello di MP, i neuroni dopaminergici devono essere normali alla nascita dell'animale e subiscono una selettiva e graduale perdita nel corso dell'invecchiamento dell'animale. I modelli farmacologici di MP, sono notevolmente quelli più impiegati fondamentalmente per ragioni di costi, e si fondano sulla riproduzione della lesione anatomico-patologica tipica della malattia, ossia la degenerazione dei neuroni dopaminergici della SNpc, indotta dalla somministrazione di neurotossine specifiche, per via sistemica o locale.

1.4.1 Modelli farmacologici

6-idrossidopamina

Il modello si basa sull'impiego della 6-idrossidopamina (6-OHDA) che è stata la prima sostanza usata in un modello di MP. Si tratta di una neurotossina specifica per i neuroni dopaminergici capace di accumularsi e di causare la morte attraverso l'induzione di stress ossidativo e apoptosi (Blum et al.; 2001; Ungerstedt et al.; 1974). E'somministrata direttamente nella SNpc o nel fascicolo che contiene le proiezioni nigro-striatali (medial forebrain bundle), poiché come tale non passa attraverso la BEE, in cui provoca un rapido e quasi completa riduzione dei neuroni dopaminergici (Fig.5). Per limitare il tempo di insorgenza della lesione e la sua entità, la tossina può essere immessa nel corpo striato e per via retrograda arriva nella SN (Sauer and Oertel; 1994) si può osservare così l'evoluzione graduale valutando l'efficacia dei trattamenti. Questo modello però non permette la formazione dei corpi di Lewy nella SNpc creando lesioni aspecifiche in altre aree cerebrali.

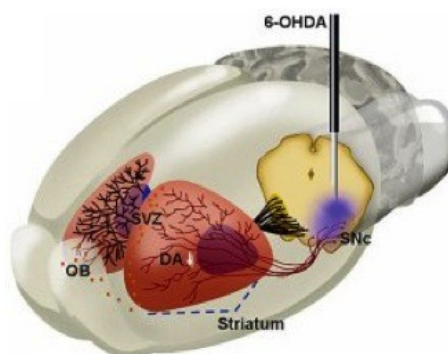


Figura 5: Modello sperimentale indotto da 6-OHDA

Rotenone

Il modello sperimentale è dato dalla somministrazione cronica, attraverso minipompe osmotiche sottocutanee, di rotenone (Betarbet et al.; 2000). Il suo uso come neurotossina "parkinsonizzante" è dovuto alla conoscenza – ormai consolidata – che una somministrazione continua e prolungata provoca un deficit del complesso I mitocondriale con degenerazione dei neuroni nigrostriatali, con perdita di tirosina idrossilasi e dei trasportatori della DA (Petrovitch et al.; 2002).

La somministrazione sistemica di rotenone provoca una degenerazione selettiva dei neuroni nigro-striatali e conseguente denervazione dopaminergica del corpo striato. Soprattutto, ed è questo l'elemento che distingue il modello del rotenone dagli altri, determina la comparsa di inclusioni citoplasmatiche nei neuroni nigrali, assimilabili alle tipiche inclusioni della MP (corpi di Lewy) per la presenza di α -sinucleina, ubiquitina e per caratteristiche ultra-strutturali (Betarbet et al.; 2000).

La morte cellulare causata dalla tossina è legata direttamente all'effetto pro-ossidante, piuttosto che al deficit energetico (come ridotta sintesi di ATP) (Sherer et al.; 2003).

MPTP

Oggi rappresenta il modello animale maggiormente impiegato. Il modello è vantaggioso perché causa una degenerazione selettiva delle strutture dopaminergiche e riproduce un quadro simile a quello umano, soprattutto nei primati.

Tuttavia non è in grado di riprodurre lesioni istologiche tipiche, come i corpi di Lewy, anche se è possibile individuare aggregati proteici simili costituiti da α -sinucleina in forma fibrillare. Gli animali che normalmente sono usati sono le

scimmie, i topi e i ratti. E' possibile variando le dosi e modo di somministrazione dell'MPTP ricreare modelli con caratteristiche differenti e modulare l'esperimento secondo le esigenze richieste.

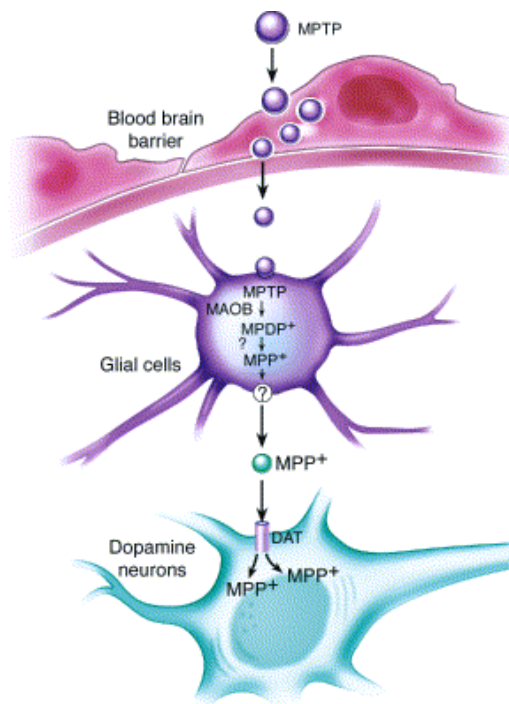


Figura 6: Metabolismo dell'MPTP dopo somministrazione sistemica (Dauer and Przedborski, 2003)

I primati non umani sono il gold standard per lo studio della MP, fino a poco tempo fa erano trattati secondo protocolli in acuto con alte dosi di MPTP. Questo induceva una rapida degenerazione dei neuroni dopaminergici. In seguito sono stati attuati dei protocolli in cronico in cui si aveva una somministrazione dilazionata nel tempo e con dosi più basse, che rispecchiavano fedelmente le alterazioni della MP umana (Przedborski et al.; 2000). Maggiormente utilizzati per ragioni di costi, etiche ed economiche sono i modelli murini. A differenza dei primati, non sviluppano un vero parkinsonismo, resistono di più alla lesione tossica data dall'MPTP e ne richiedono dosi superiori perché si abbia neurodegenerazione.

La lesione è prodotta mediante iniezione intraperitoneale di 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), scoperta per caso negli anni '80 negli USA, durante l'osservazione di numerosi casi di parkinsonismo in giovani soggetti tossicodipendenti. Si accertò che questi, consumarono uno stupefacente di sintesi, assumendo inconsapevolmente la neurotossina che si forma come prodotto

collaterale del processo chimico (Langston et al.; 1983). L'MPTP passa attraverso la BEE, dove è captato dalle cellule gliali. I mitocondri di queste cellule contengono le MAO-B che trasformano l'MPTP in MPDP⁺ e con un meccanismo ancora sconosciuto si tramuta nel suo metabolita attivo (MPP⁺) (Fig.6). L'MPP⁺ è rilasciato nello spazio sinaptico ed è in grado di penetrare e accumularsi selettivamente nelle cellule della SNpc, sfruttando il trasportatore della dopamina (DAT). All'interno del neurone esplica la sua azione tossica legandosi al complesso I mitocondriale compromettendone il funzionamento (Arif and Khan; 2011), provocando in seguito morte cellulare per deficit di ATP (Fig.7). La neurotossicità determina anche l'alterazione dell'omeostasi del calcio, che comporta un'elevazione delle concentrazioni di Ca²⁺ che porta all'attivazione di enzimi calcio-dipendenti (come le caspasi I e II). Si ha la produzione dei ROS e di ferro che attraverso la reazione di Fenton produce radicali ossidrilici dannosi e altamente reattivi.

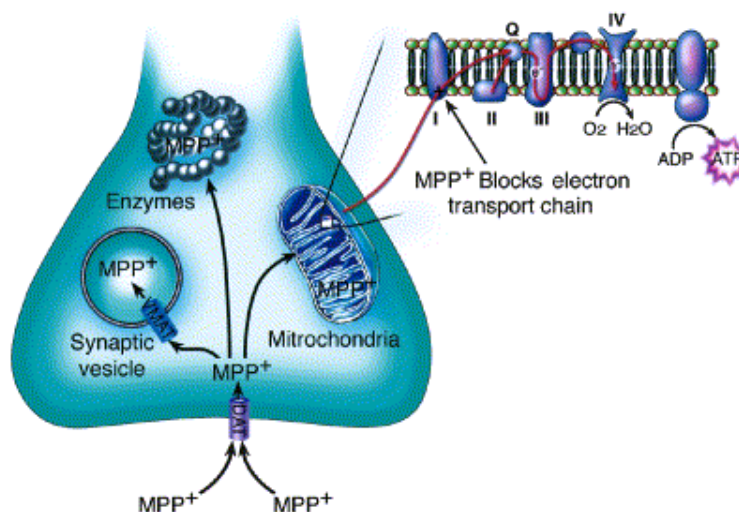


Figura 7: Siti di azione dell'MPP⁺ in una cellula dopaminergica (Dauer and Przedborski, 2003)

1.4.2 Modelli transgenici

Alla base hanno alterazioni specifiche a carico dell'espressione del gene codificante per l' α -sinucleina umana e si differenziano sostanzialmente in relazione all'espressione del gene se è ubiquitaria oppure limitata alla SNpc (Kirik et al.; 2003).

In alcuni modelli sono utilizzati vettori di tipo plasmidico durante le prime fasi di sviluppo, dell'animale, inducendo perciò un'espressione del gene a livello sistemico; così si ha un accumulo a livello neuronale di clusters proteici in varie aree cerebrali e deficit motori. Per ottenere una maggiore specificità nelle mutazioni, è stato introdotto un promoter del gene per la tirosina-idrossilasi, in modo da favorire un'espressione del gene per l' α -sinucleina nei neuroni dopaminergici della SNpc.

In altri modelli è aumentata l'espressione del gene per l' α -sinucleina introducendolo selettivamente nella SNpc dell'adulto, mediante vettori adenovirali. Le lesioni sono più manifeste e specifiche. Sebbene non sia stato ancora approvato un modello animale di MP, il loro impiego continua a fornire informazioni preziose sia per la comprensione della fisiopatologia della malattia che per la valutazione di nuovi approcci terapeutici. I modelli animali, rappresentano un terreno di sperimentazione di enorme valore, per le possibili innovazioni terapeutiche, in particolare nello sviluppo di terapie neuroprotettive, ossia in grado di bloccare la progressione del danno e promuovere un recupero funzionale dei nuclei della base.

1.5 La pargilina

La pargilina (Fig.8) è un farmaco inibitore delle monoamino ossidasi (I-MAO, IMAO), l'enzima che metabolizza le catecolamine (adrenalina, noradrenalina, melatonina, dopamina). E' un farmaco selettivo per le monoammino ossidasi B (MAO B), che blocca in modo irreversibile.

Le IMAO bloccano la deaminazione ossidativa delle amine endogene ciò determina un aumento dei livelli sia pre-sinaptici, che sinaptici delle catecolamine. In letteratura è noto che la pargilina prevenga gli effetti provocati dalla somministrazione di MPTP, in modelli sperimentali di primati (Langston et al.;1984). Infatti non consente la conversione dell'MPTP in MPDP da parte delle MAO B. Gli IMAO rientrano nell'insieme delle terapie che hanno lo scopo di rallentare i processi patogenetici della MP ritardandone la sintomatologia.

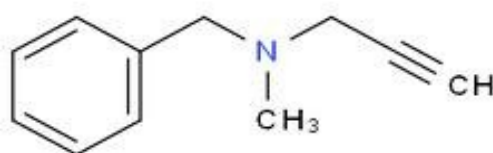


Figura 8: Molecola della pargilina

1.6 *Metabolismo Cerebrale*

Il cervello adulto rappresenta circa il 2% del peso corporeo, richiede circa il 50% dell'ossigeno e il 10% del glucosio ematico. Il consumo totale dell'ossigeno cerebrale e la produzione di anidride carbonica sono totalmente identici, questo significa che il glucosio, nel cervello umano, è usato dai neuroni come substrato energetico. Questo organo si distingue dagli altri per alcune caratteristiche metaboliche: può ricavare l'energia necessaria al suo funzionamento solo dalla scissione aerobica del glucosio (ciclo di Krebs e fosforilazione ossidativa) perché non è in grado di immagazzinare quantità significative di glucosio in forma di glicogeno. Il metabolismo cerebrale del glucosio non è modulato dall'insulina, che non può attraversare la BEE. Non possiede molecole come la mioglobina, atte a legare reversibilmente l'ossigeno e la produzione cerebrale di lattato tramite la glicolisi anaerobica è trascurabile e l'utilizzazione di corpi chetonici derivati dagli acidi grassi si osserva solo in condizioni di digiuno prolungato (Fig.9). Per questi motivi, il funzionamento del sistema nervoso dipende interamente dal continuo rifornimento di glucosio e ossigeno da parte del circolo sanguigno (Treccani; 2010).

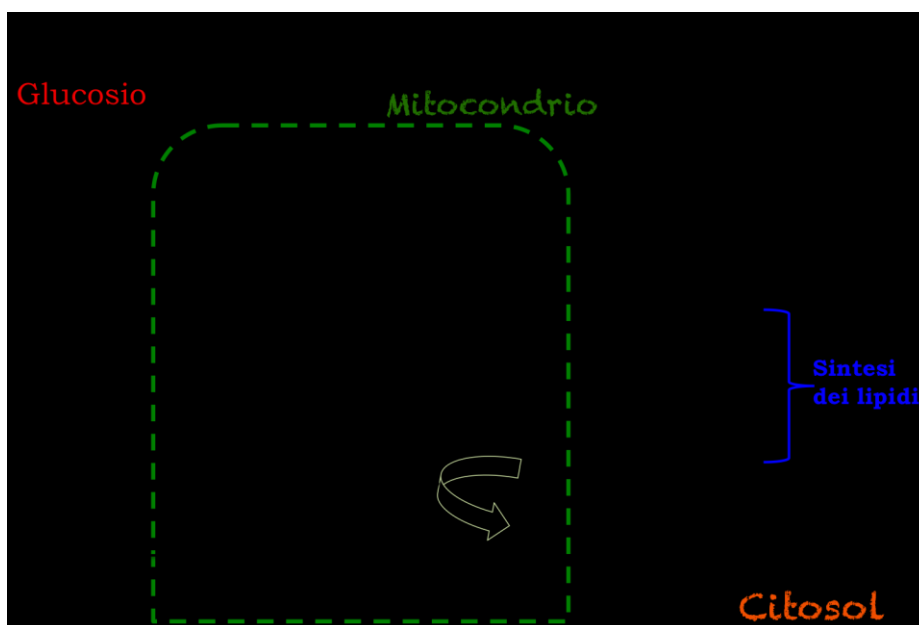


Figura 9: Relazione tra ciclo di Krebs e metabolismo lipidico

Le cellule deputate al mantenimento e all'incameramento dei substrati metabolici sono gli astrociti, cui arrivano i segnali neuronali che permettono il rilascio delle riserve metaboliche grazie ai recettori di membrana specifici per i neurotrasmettitori, responsabili della trasmissione sinaptica tra due neuroni. Le cellule del Sistema Nervoso, hanno correlato il consumo di energia in base alla loro funzione: studi condotti con metodi biochimici hanno dimostrato che il consumo di adenosintrifosfato, ATP, è alla base del mantenimento della cellula in condizioni fisiologiche. Per questo scopo il cervello utilizza circa il 60% di tutto il glucosio (pari a circa 120 g/die) e il 20% di tutto l'O₂. Il glucosio cerebrale dopo il trasporto dal sangue al cervello è metabolizzato attraverso la glicolisi, trasformato prima in piruvato, che entra nel ciclo degli acidi tricarbossilici mitocondriale per la produzione di ATP mediante fosforilazione ossidativa di conseguenza ossidato quasi totalmente a H₂O e CO₂. Secondo la seguente reazione:



L'esochinasi del cervello ha un'affinità molto alta per il glucosio ed espressa a concentrazioni almeno 20 volte maggiore. Mediante la glicolisi, il ciclo di Krebs e il ciclo dei pentoso-fosfati è prodotta ATP (usata come energia dalla cellula) e NADPH (sfruttato come equivalenti riducenti biosintetici). La maggior parte dell'ATP è utilizzata dal cervello per il mantenimento dell'attività delle pompe ioniche, come la Na⁺/K⁺ ATPasi, che lo adopera per il mantenimento del potenziale di membrana. Durante i periodi di maggiore attivazione del cervello aumenta la produzione di ATP tramite la glicolisi, aumentando la produzione di lattato e con l'aumento del metabolismo cerebrale di glucosio rispetto all'ossigeno (Fox P.T.; et al.;1988). Nel cervello abbiamo riserve molto limitate di glicogeno (immagazzinato negli astrociti e il suo consumo dura pochi min), per questo motivo il glucosio gli deve arrivare costantemente dal sangue (dove abbiamo i valori normali di glicemia tra 80 e 110 mg/dl). La correlazione tra cervello e glucosio si evidenzia in modo drammatico nei fenomeni di ipoglicemia: è stato osservato che quando la glicemia scende al disotto di 60 mg/dl diminuisce l'attenzione: associata a fame, sonnolenza e sudorazioni.

Se la concentrazione ematica di glucosio si porta ulteriormente sotto intorno a 40 mg/dl si va in grave ipoglicemia con gravi conseguenze per l'organismo che nei casi più gravi porta coma, convulsioni, danni permanenti e morte. Il cervello contrasta quindi la sua vulnerabilità all'ipossia e all'ipoglicemia con la capacità di regolare la propria perfusione sanguigna tramite meccanismi sistemici e locali. In condizioni basali, riceve circa 800 ml/min di sangue, pari a un settimo della gettata cardiaca, e consuma circa il 60% del glucosio e il 20% dell'ossigeno di tutto il corpo. La spesa metabolica totale del cervello (circa il 20% delle chilocalorie totali giornaliere) e il flusso sanguigno che lo perfonde restano costanti in tutte le condizioni fisiologiche, dal sonno profondo al lavoro mentale intenso, variando solo il flusso sanguigno regionale, che di volta in volta aumenta nelle aree cerebrali più attive e diminuisce in quelle meno attive (Treccani; 2010).

Il glucosio è una molecola che attraversa la BEE e può in questo modo arrivare nei vari compartimenti del cervello. Sia sulla BEE sia sulla membrana cellulare sono presenti specifiche proteine trasportatrici della famiglia GLUT: GLUT1 (prevalente a livello della BEE) porta il glucosio oltre che nel cervello anche nei globuli rossi e in molti altri tessuti. GLUT3 (prevalente presente a livello neuronale) è espresso nel cervello e lavora in sinergia con GLUT1 per rendere massimo l'assorbimento del glucosio. Il tessuto nervoso è molto ricco di lipidi (sia come componenti strutturali sia nella trasduzione del segnale) oltre al colesterolo sono molto abbondanti i fosfolipidi: glicerofosfatidi e sfingolipidi (ceramidi, sfingomieline, cerebrosidi, gangliosidi, ecc). In condizioni particolari (allattamento o digiuno prolungato), il cervello può utilizzare substrati diversi dal glucosio, come i corpi chetonici. Il NADPH che è prodotto con la degradazione del glucosio oltre che per le biosintesi riduttive, ha un importante ruolo protettivo del cervello rimuovendo le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), con l'ausilio degli enzimi: superossido dismutasi (SOD) e glutatione perossidasi.

La presenza di neurotrasmettitori nello spazio sinaptico indica la presenza di neuroni attivi. Gli astrociti hanno la capacità di rispondere ai neurotrasmettitori e modulare, in tal modo, il loro metabolismo energetico. Nel cervello si realizza un equilibrio molto importante tra: glutammato, glutamina, NH_4^+ , α -chetoglutarato, GABA.

Molti di questi neurotrasmettitori sono amminoacidi e la loro principale funzione nel cervello è la sintesi dei neurotrasmettitori infatti abbiamo: amminoacidi che sono essi stessi neurotrasmettitori (come il glutammato), le catecolammine derivate dalla tirosina (la dopamina e la norepinefrina), la serotonina (sintetizzata dal triptofano), il GABA (sintetizzato dal glutammato) e l'acetilcolina (da acetil-CoA e Colina) e i Neuropeptidi. La glutammina è intensamente prodotta nel sistema nervoso centrale sfruttando l'attività della glutammina sintetasi (GS), presente nelle cellule astrogliali. Una parte del glutammato ottenuto dalla deaminazione degli amminoacidi ramificati cattura l'ammoniaca trasformandosi in glutammina, che è precursore del glutammato e del GABA. L'altra parte del glutammato, rilasciato nello spazio extracellulare si addentra negli astrociti dove è trasformato in glutammina dalla GS, dall'astrocita (in scambio con il glutammato che entra) per spostarsi nel neurone dove è trasformato dalla glutamminasi in glutammato. Gli astrociti quindi hanno la capacità di rispondere ai neurotrasmettitori e modulare, in tal modo, il loro metabolismo energetico. Tutti i processi metabolici a livello cerebrale comunque hanno alla base il mantenimento di uno stato di equilibrio attraverso il consumo di substrati ad alta energia, come i glucidi, in grado di fornire elevate quantità di ATP. L'insorgenza di un processo patologico porta alterazioni dei profili metabolici delle cellule. Studi genetici, infatti, hanno dimostrato che alla base di un avvenimento patologico ci sono delle mutazioni dei processi metabolici e in particolar modo della glicogenesi. Sebbene questa sia maggiormente utilizzata, si possono creare delle condizioni in grado di favorire la produzione energetica alternativamente. Si è visto, inoltre, che le cellule nervose sono più sensibili rispetto ad altre, alla diminuzione delle risorse energetiche e di ossigeno. Tali stress ipossici compromettono da un lato la capacità di svolgere determinate azioni dall'altro possono essere alla base di mutazioni permanenti che provocano la patologia. E' stato dimostrato con sempre maggiore evidenza che nella patogenesi di svariate malattie di tipo neurodegenerativo possono essere coinvolte la produzione di specie ossigeno reattive (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS) con conseguente una disfunzione a livello mitocondriale. Nel MP, sembra che il coinvolgimento mitocondriale abbia un ruolo diretto nella patogenesi della malattia stessa. Di conseguenza la quantità ROS che

sono generate da queste cellule nel corso del metabolismo ossidativo è estremamente elevata. Per questo motivo sempre più evidenze convergono a favore di un coinvolgimento dello stress ossidativo e della disfunzione mitocondriale nel processo di morte neuronale, fenomeno tipico delle malattie neurodegenerative (Dringen, 2000). Tale particolare tipo di stress è cruciale per la modulazione di importanti funzioni cellulari come l'apoptosi, la mobilitazione del calcio, il trasporto ionico e tutti i fenomeni implicati nella eccitossicità (Emerit and Edeas, 2005). Lo stress ossidativo ha inizio da uno sfalsamento degli equilibri esistenti tra la capacità fisiologica di produrre antiossidanti nel SNC e la sintesi e produzione di radicali liberi (Andersen, 2004). Questo disequilibrio ci fa capire l'estrema importanza delle dinamiche concernenti gli antiossidanti, così come i radicali liberi, nel SNC.

1.7 Mitocondrio

Il mitocondrio Fig.10, svolge la maggior parte delle ossidazioni cellulari e produce la maggior parte dell'ATP delle cellule animali.

E' racchiuso da due membrane concentriche che racchiudono la matrice che è il comparto principale di lavoro; infatti questa contiene una grande varietà di enzimi tra cui quelli deputati alla conversione del piruvato e acidi grassi ad acetil-coenzima A. L'insieme delle reazioni produce una grossa quantità di NADH e FADH₂ che trasportano gli elettroni necessari alla respirazione mitocondriale operata dal complesso di respirazione localizzato sulla membrana interna.



Figura 10: Mitocondri

La catena respiratoria usa l'energia derivata dal trasporto di elettroni, che produce un gradiente protonico grazie al potenziale di membrana e dalla differenza di pH. La grande quantità di energia libera rilasciata fornisce la base per la produzione di ATP da parte dell'ATP sintetasi. (Alberts et al.; 2009). Quando questo sistema è alterato per la comparsa di uno stato patologico, comporta la rottura della catena di respirazione che non converge più nella produzione di ossigeno e ATP ma di specie molto reattive e ossidanti.

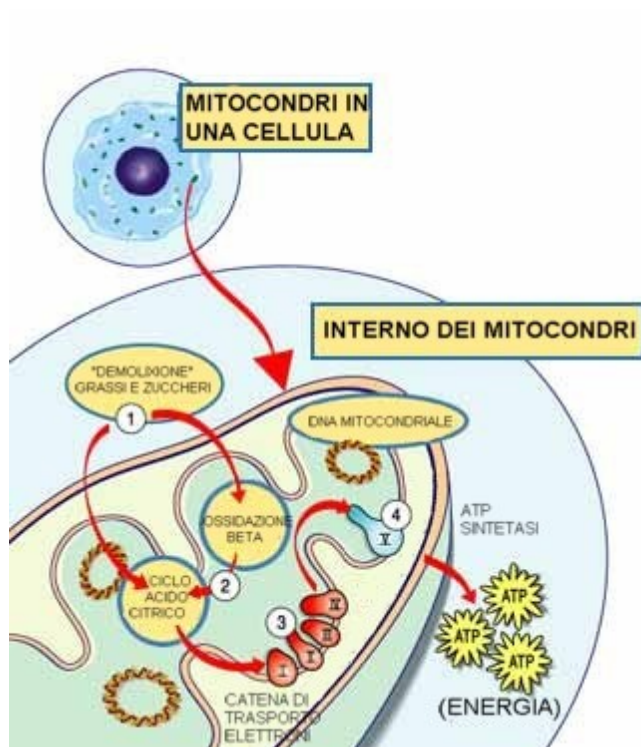


Figura 11: Struttura interna e funzione del mitocondrio

1.8 Ossigeno

L'Ossigeno molecolare (O_2), è fondamentale per l'attività del Sistema Nervoso Centrale (SNC), utilizzato non solo per la respirazione cellulare ma anche per la sintesi e metabolismo di varie e importanti biomolecole sostanze neuroattive (Watanabe et al.; 1997). La produzione di ATP rappresenta uno dei tanti processi biochimici del cervello in cui l'ossigeno ha un ruolo fondamentale (Bazzu et al.; 2009). L'osservazione costante delle concentrazioni di ossigeno e le relative variazioni, può dare importanti informazioni circa il metabolismo energetico nel cervello legato al consumo di glucosio (Fillenz; 2005) o di lattato (Aubert et al.; 2005).

1.9 Glucosio

Il glucosio è il substrato principalmente usato per la produzione di energia sottoforma di ATP e la sua presenza negli spazi extracellulari rappresenta uno dei fattori importanti nel controllo del metabolismo energetico (Lowry et al., 1998; Magistretti et al., 1999; Fillenz et al., 2005). L'osservazione della concentrazione del glucosio potrebbe essere utile per valutare lo stato fisiologico di un tessuto e prevenire alterazioni dovute alla mancanza di un substrato fondamentale. Attraverso la glicolisi, il glucosio è immediatamente coinvolto nella produzione di ATP, che è il vettore energetico delle cellule. Inoltre, dato che le cellule del sistema nervoso non sono in grado di metabolizzare i lipidi, il glucosio rappresenta la loro fonte principale di energia. Il monitoraggio della quantità di glucosio può essere affidato a molteplici strumenti tra cui alcuni affidati a saggi enzimatici e spettrofotometrici altri diretti e immediati affidati ai biosensori che hanno alla base l'enzima Glucosio Ossidasi (GOx).

1.10 Lattato

Il lattato (Lat) è un'importante molecola implicata nella bioenergetica cerebrale, come prodotto della glicolisi (Fillenz et al., 2005) o come substrato energetico dei neuroni (Magistretti et al., 1999). L'osservazione delle variazioni di questo

metabolita possono essere utili per valutare lo stato di salute dei tessuti perché indice di anaerobiosi e di sofferenza cellulare.

Il lattato è ossidato dalla lattato ossidasi (LOx), che serve alla sua quantificazione mediante strumenti spettrofotometrici o amperometrici.

1.11 ATP

L'adenosin trifosfato, ATP, è una molecola macroenergetica implicata in numerose funzioni. E' di notevole importanza per il mantenimento delle condizioni fisiologiche in un organismo. La determinazione dell'ATP in un campione biologico è sempre stata affidata a metodi spettrofotometrici, di bioluminescenza, cromatografici, che sono piuttosto lunghi per il numero di passaggi che prevede il metodo analitico (Compagnone et al.;1996).

Per facilitare la lettura e avere una misura diretta e istantanea dell'ATP, oggi giorno sono stati creati dei dispositivi amperometrici associati a enzimi. Gli enzimi deputati alla quantificazione dell'ATP sono la Glucosio Ossidasi (GOx) e l'Esochinasi (HEX).

1.12 Strumenti per lo studio del metabolismo cerebrale

La Microdialisi

Introdotta da Delgado all'inizio degli anni '70, la microdialisi è una tecnica che permette di misurare le variazioni nel tempo dei livelli di neurotrasmettitori, metaboliti a seguito di trattamenti farmacologici o di stimolazioni ambientali. Rende, virtualmente, possibile il recupero delle sostanze dalle regioni cerebrali con un limitato trauma tissutale (Benveniste, 1991). Il principio su cui si fonda è la riproduzione della funzione svolta da un capillare sanguigno negli scambi tra il torrente ematico e la popolazione cellulare, permettendo, sia il recupero (recovery) sia la somministrazione di sostanze in maniera topica. Questa tecnica è applicata principalmente per la ricerca preclinica dei correlati neurobiologici del comportamento e per studiare il meccanismo d'azione dei farmaci. E' una tecnica che ci consente di monitorare in vivo il livello di numerose sostanze presenti nel compartimento extra-cellulare. E' realizzata grazie ad una specifica sonda che è immessa direttamente nell'area cerebrale di interesse e che, grazie a processi di diffusione passiva, raccoglie selettivamente le molecole presenti nei liquidi extracellulari. Si ottengono informazioni sui livelli di neurotrasmettitori, metaboliti dei neurotrasmettitori sia in condizioni fisiologiche o in seguito alla comparsa di stati patologici. Non tutte le molecole presenti però possono essere raccolte perché la fibra da dialisi è capace di limitare il passaggio a composti o molecole ad alto peso molecolare, ma facilita il recupero di quelli a basso peso molecolare compatibili con la porosità della membrana (cut-off di membrana).

Nella sede dell'impianto la membrana dialitica, è permeabile a H₂O e piccoli soluti, ma divide due compartimenti fluidi distinti: il fluido extracellulare che è all'esterno della membrana e il ringer di perfusione che è spinto da un flusso costante all'interno della membrana. In mancanza di una pressione osmotica e/o di un potenziale elettrico, il movimento dei soluti fra i due compartimenti è imposto esclusivamente alla diffusione secondo il gradiente di concentrazione. Le sostanze presenti nello spazio extracellulare possono così diffondere all'interno della sonda ed

essere recuperate nel campione di micro dializzato, ed essere analizzate con diversi sistemi di lettura monitorizzandone le variazioni.

In senso contrario, le sostanze presenti nel ringer di perfusione possono diffondere nello spazio circostante alla sonda e interagire con le cellule neuronali e perturbando le concentrazioni delle molecole nel fluido extracellulare cerebrale (ECF).

Sebbene sia una tecnica molto semplice sia nella procedura sia per il principio di funzionamento, ci sono molti elementi che possono in qualche modo influire sui risultati ottenuti. Occorre considerare che si tratti sempre di una procedura invasiva, anche se i danni che può arrecare sono minimi.

La membrana dialitica comunica con il fluido extracellulare mediante il principio della diffusione, le sostanze si muovono secondo il proprio gradiente di concentrazione e sono poi rilevate nel micro dializzato. Diversi sono gli elementi influenzano il recovery delle sostanze dallo spazio extracellulare come la composizione del ringer di perfusione, poiché altera l'ambiente adiacente alla membrana dialitica; la lunghezza della membrana dialitica, tanto maggiore è l'area in contatto con lo spazio extracellulare tanto maggiore sarà la diffusione delle molecole attraverso la membrana e quindi il recupero delle stesse e la velocità di diffusione nello spazio extracellulare, che è direttamente collegata alla natura della matrice parenchimale e al fattore di tortuosità λ (coefficiente adimensionale che descrive il di scostamento delle molecole dalla traiettoria rettilinea). Insieme a queste abbiamo il cut-off della membrana dialitica, che è dato dal grado di permissività della membrana, determina le dimensioni delle sostanze che possono diffondere tra i due compartimenti (come i neurotrasmettitori e altre sostanze a basso peso molecolare) e quelle che non possono attraversare la membrana (come le proteine), e il flusso di perfusione del ringer, determina il tempo in cui le molecole hanno la possibilità di equilibrarsi tra i due compartimenti, più lento è il flusso, maggiore sarà il tempo a disposizione delle molecole per raggiungere la stessa concentrazione tra l'interno e l'esterno della membrana. E'importante sottolineare che una comparazione tra concentrazione di un analita in un beaker rispetto a quella identificata in un campione di dializzato è definita recovery relativo espresso in percentuale; mentre per recovery assoluto è la quantità di analita raccolto in un determinato periodo espresso in grammi. I due indici hanno un comportamento inverso: il recovery relativo cresce al

diminuire del flusso mentre il recovery assoluto diminuisce alla riduzione del flusso negli esperimenti in vitro.

In vivo se è mantenuta costante la velocità di perfusione il valore di recovery relativo rimane costante e il recovery assoluto di una sostanza si modifica in base alla sua generazione o al rilascio nel tessuto.

Microsensori e Biosensori

I microsensori e i biosensori (Fig.12) sono degli strumenti analitici costituiti da un trasduttore che può trasformare un segnale chimico in un segnale elettrico quantificabile. I biosensori hanno in più un biocatalizzatore (enzima, cellula o tessuto), che consente la trasformazione del segnale. Solitamente, nei biosensori, il biocatalizzatore, ad esempio un enzima, è immobilizzato su una membrana o all'interno di una matrice insolubile in modo da essere mantenuto a stretto contatto con il trasduttore che essere utilizzato.

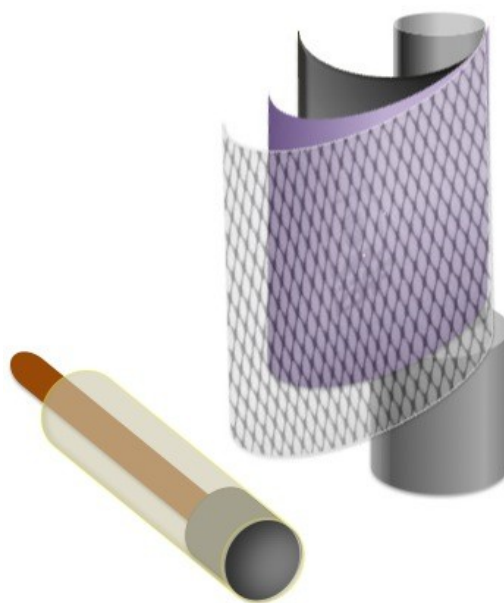


Figura 12: Rappresentazione schematica di un microsensore e di un biosensore costituito da più strati sovrapposti

Sono dispositivi con potenzialità enormi, sia in termini di interesse scientifico, sia in termini di applicazioni commerciali; infatti possono trovare applicazione in molteplici campi di studio come, in campo medico diagnostico, nell'analisi dei pesticidi e contaminanti delle acque, in remoto per contaminazioni batteriche nelle attività bioterrorismo nell'analisi dei patogeni e degli antibiotici negli alimenti. Questi congegni possono avere differenti tipi di trasduttore in relazione al tipo di analisi che deve essere effettuata. L'amperometria misura una corrente a un potenziale applicato costante. Su un metallo inerte, applicando un potenziale anodico, o catodico, relativamente ad un elettrodo di riferimento otterrò sul metallo la misura di una corrente anodica o catodica, proporzionale al numero delle specie in soluzione che si possono ossidare o ridurre.

2 Scopo della Ricerca

Il Morbo di Parkinson è una patologia neurodegenerativa, che porta alla compromissione dello stato fisiologico della cellule nervose della SNpc con conseguente morte cellulare. Fin a oggi gli studi su modelli sperimentali di MP si sono concentrati sullo studio delle cause e sulla misura degli effetti provocati dall'impiego di neurotossine usate per indurre la malattia.

Lo scopo della mia tesi è stato di valutare durante un trattamento subacuto con la neurotossina MPTP gli effetti sui metaboliti energetici e determinare un possibile effetto neuroprotettivo della pargilina. Il lavoro si suddivide di due parti, una prima parte studia, impiegando una tecnica validata e ampiamente utilizzata che è la microdialisi quali sono i cambiamenti nello spazio sinaptico dei metaboliti energetici glucosio, lattato e piruvato in seguito alla somministrazione di MPTP e gli effetti della pargilina su questi. La seconda parte utilizza un sistema innovativo rappresentato dai biosensori amperometrici per il glucosio e lattato collegati a un dispositivo biotelemetrico con cui misurare la neurochimica cerebrale.

Una volta sviluppate, le unità biotelemetriche impiantabili, sono state usate con successo in associazione con il sensore a microvibrazioni per valutare il movimento e il microsensore per la lettura di O₂, nello striato. L'analisi dei segnali derivati dai sensori sopra indicati, consente lo studio in tempo reale di pathway biochimici implicati nel metabolismo energetico cerebrale e di validare i dati ottenuti con i precedenti esperimenti di microdialisi.

3 Materiali e Metodi

3.1 Reagenti

Tutti i reagenti presentavano un alto grado di purezza e sono stati sciolti in acqua bi distillata deionizzata (Milli-Q). La glucosio ossidasi (GOx) di *Aspergillus Niger* (EC 1.1.3.4.), lattato ossidasi (LOx) di *Pediococcus species* (EC 1.1.3.2.), esochinasi (HEx) di *Saccharomyces cerevisiae*, monoammino ossidasi B umana (MAO-B) ricombinante, espressa in *baculovirus infected BTI insect cells*, o-fenilendiamina (o-PD), d(+)-glucosio e L-lattato, 2-fenilettilammina idrocloride, nitrocellulosa (NC), poliuretano (PU), polietilenimmina (PEI), acido ascorbico (AA), acido urico (UA), L-DOPA, DOPAC, noradrenalina (NE), dopamina (DA), acido 5-idrossi-indolo-acetico (5-HIAA), HVA, 3-MT, serotonina (5-HT), K₂HPO₄, KH₂PO₄, EDTA, metanolo (MeOH, HPLC grade), sodio octilsolfato (OSA), MPTP, pargilina sono stati acquistati dalla Sigma Chemicals (Milano, Italy). D-Amfetamina solfato è stata acquistata da Merck AG (Darmstadt, Germany). Le soluzioni concentrate di glucosio (1 M) sono state preparate in acqua e lasciate stabilizzare per 24 h e utilizzate dopo aver raggiunto l'equilibrio tra le due forme anomeriche; le soluzioni sono state usate per la calibrazione dopo 24 h. La soluzione concentrata di lattato (1 M) è stata preparata in acqua e lasciata in frigorifero (4°C). La soluzione concentrata 2-fenilettilammina idrocloride (1 M) è stata preparata in acqua e lasciata in frigorifero (4°C). La soluzione di tampone fosfato (PBS) è stata preparata usando NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na₂HPO₄ (8.1 mM), e KH₂PO₄ (1.47 mM) della Sigma, in seguito corretta a un pH 7.4.

Le soluzioni degli enzimi sono state preparate sciogliendo unità di GOx, di LOx e di HEx in di PBS e tenute a una temperatura di 4°C. La soluzione delle MAO-B acquistata in forma liquida è stata conservata a -80°C. La soluzione di polietilenimmina all'1% è stata ottenuta sciogliendo la sostanza in acqua. Il poliuretano è stato sciolto in tetraidrofurano per ottenere una soluzione al 1%. La polvere monomerica di o-PD è stata disciolta in PBS degasato immediatamente prima dell'elettrosintesi voltammetrica del polimero (poly-o-PD, PPD) sulla superficie dell'elettrodo di platino. La nitrocellulosa al 4% è stata sciolta in etanolo/dietilere.

Le soluzioni stock di AA, delle catecolamine e delle indolamine sono state preparate in acido fosforico e conservate a -80 °C. L'UA è disciolto in acqua Milli Q tiepida nella quantità di 1 mg/10 ml con l'aggiunta di 100 µl di NaOH 0.1N. Tutte le soluzioni sono diluite nel ringer alla concentrazione necessaria al momento dell'uso. Le soluzioni di MPTP, pargilina e d-anfetamina sono state preparate pochi minuti prima della somministrazione, sciogliendo i composti in soluzione salina (MPTP e pargilina) e ringer (d-anfetamina).

3.2 *Animali*

Tutte le procedure sono state consentite dalla Comunità Europea della direttiva 86/609 inclusa nel decreto No. 116/1992 del Ministero Italiano della Sanità Pubblica. Per i nostri i esperimenti sono stati usati ratti maschi di razza Wistar (Morini R. Emilia, Italia), con un peso compreso tra 250 g e i 350 g. Gli animali sono stati mantenuti rispettando il ciclo circadiano 12 ore di luce e 12 ore di buio e a una temperatura costante di 21°C con acqua e cibo ad libitum.



Figura 13: Ratti Wistar utilizzati in questo studio

3.3 *Chirurgia stereotassica*

La salute degli animali è stata controllata prima di ciascun intervento, in accordo con le linee guida pubblicate (Wolfensohn e Loyd; 2003). La chirurgia stereotassica sotto anestesia di cloralio idrato (400 mg Kg-1) è stata realizzata mantanendo la temperatura corporea dell'animale a 37°C, utilizzando un tappetino isotermico.

La doppia sonda, i microsensori e i biosensori sono stati impiantati nello striato di destra utilizzando le seguenti coordinate stereotassiche dell'atlante di Paxinos & Wotson (Paxinos & Wotson, 2007): A/P + 0.5 dal bregma, + 2.5 M/L e - 4.0 D/V dalla dura madre. Gli elettrodi ausiliario e riferimento sono stati impiantati nella

corteccia parietale; mentre l'unità biotelemetrica è stata fissata grazie a due viti inserite nel tavolato cranico (Bazzu et al., 2009). Dopo la chirurgia gli animali sono stati collocati in cilindri di plexiglas ($\varnothing = 45$ cm) e mantenuti in condizioni di luce e di temperatura controllate, con libero accesso a cibo e acqua. Gli esperimenti hanno avuto inizio dopo 24 ore dalla chirurgia. Il monitoraggio delle specie neurochimiche di interesse recuperate con la microdialisi hanno avuto inizio con l'analisi all'HPLC e Iscus, mentre per i microsensori e biosensori aveva inizio dal momento in cui erano connessi al sistema telemetrico anche durante il libero movimento del ratto all'interno del bowl.



Figura 14: Dopo l'inserimento del sensore amperometrico nello striato destro, si ottiene una base su cui poggiare il dispositivo biotelemetrico. Nell'insero, si può vedere l'unità biotelemetrica impiantata e fissata al tavolato cranico dell'animale

3.4 *Trattamento con MPTP*

Gli animali hanno ricevuto 1 singola somministrazione intraperitoneale di MPTP al giorno, a dosi scalari (rispettivamente 25, 15 e 10 mg/Kg/i.p./2.5 ml soluzione salina), per 3 giorni consecutivi dopo 60' dall'inizio dell'esperimento di microdialisi e con i biosensori. Il gruppo controllo ha ricevuto 3 somministrazioni di soluzione salina (2.5 ml i.p.) secondo le modalità mostrate nella tabella della figura 15.

3.5 *Trattamento con pargilina*

Gli animali hanno ricevuto 1 somministrazione di pargilina (15 mg/Kg/i.p./2.5 ml soluzione salina) per tre giorni consecutivi 40' prima dell'iniezione di MPTP durante l'esperimento di microdialisi.

GRUPPO	Controllo	Pargilina	MPTP	Pargilina + MPTP
DAY 1	VEICOLO VEICOLO	PARGILINA 15 mg/Kg VEICOLO	VEICOLO MPTP 25 mg/Kg	PARGILINA 15 mg/Kg MPTP 25 mg/Kg
DAY 2	VEICOLO VEICOLO	PARGILINA 15 mg Kg VEICOLO	VEICOLO MPTP 15 mg/Kg	PARGILINA 15 mg/Kg MPTP 15 mg/Kg
DAY 3	VEICOLO VEICOLO	PARGILINA 15 mg/Kg VEICOLO	VEICOLO MPTP 10 mg/Kg	PARGILINA 15 mg/Kg MPTP 10 mg/Kg

Tabella 1: Protocollo sperimentale per il trattamento con MPTP e pargilina

3.6 *Trattamento con D-amfetamina*

Gli animali hanno ricevuto 1 somministrazione di d-amfetamina (2 mg/Kg/s.c./2.5 ml soluzione salina) dopo 60' dall'inizio dell'esperimento con i sensori in telemetria come riportato in tabella (Fig.16).

GRUPPO	Controllo	d-Amfetamina
DAY		
DAY 1	VEICOLO	d-Amfetamina 2 mg/Kg

Tabella 2: Protocollo sperimentale per il trattamento con D-amfetamina

3.7 Doppia sonda microdialitica

La sonda da microdialisi striatale è stata sviluppata dal mio gruppo di ricerca, (Rocchitta et al., 2005), combinando insieme due emisonde indipendenti con disegno concentrico (Fig.15). La doppia sonda ha due differenti inlets ai quali corrispondono due differenti outlets, che permette la raccolta di campioni separati dallo stesso sito cerebrale. La sonda è stata fabbricata utilizzando due pezzi di polietilene (i.d. 0.58 mm, portex, Hythe, UK) e di capillare di silicio (diametro 0.15 mm; Scientific Glass Engineering, Milton Keynes, UK) che è stato inserito all'interno di due fibre da dialisi con membrana semipermeabile di poliacrilonitrile (cut-off del peso molecolare di 12 KD, Filtral 16 Hospal Industrie, France) in cui un'estremità è stata sigillata con colla epossidica ad asciugatura rapida.

Le due unità di tubo di silice che servono come ingressi, sono inoltre state ricoperte con una sezione di tubo polietilene. La membrana semipermeabile è rivestita con resina epossidica lasciando una lunghezza attiva di 4 mm. Infine le due sonde microdialitiche, sono strettamente ravvicinate. Ogni sonda ha un diametro finale di circa 0.22 mm e il diametro finale della sonda doppia è di circa 0.45 mm.



Figura 15: Doppia sonda microdialitica

Procedura microdialitica

Gli esperimenti di microdialisi sono stati condotti il giorno seguente l'impianto. Una pompa da microinfusione (CMA/100; Microdialysis, Stockholm, Sweden) perfonde il ringer a un flusso costante mediante una o più siringhe, ciascuna collegata al corrispondente inlet della sonda da dialisi con un tratto di tubo in polietilene (Fig.16). Ogni 20 minuti si è proceduto al recupero manuale dei campioni di dializzato che, depositati in provette da microcentrifuga del volume di 250 μl , sono stati immediatamente iniettati nei sistemi analitici.

Durante tutti gli esperimenti sono stati utilizzati i seguenti flussi di perfusione:

- flusso di 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ per l'analisi neurochimica delle catecolamine, indolamine, AA e UA (HPLC-EC);
- flusso di 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ per l'analisi del metabolismo energetico (CMA/ISCUS).

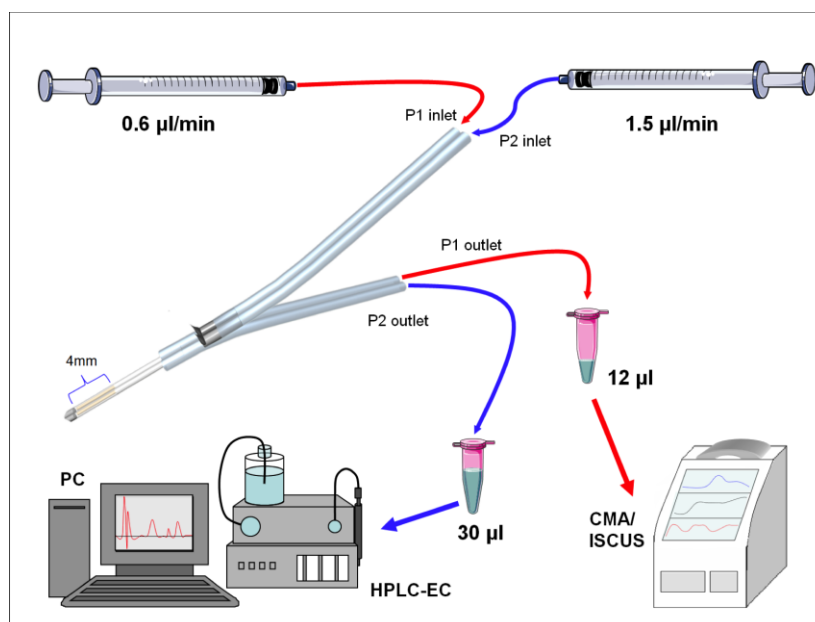


Figura 16: Procedura per la microdialisi sistemi analitici

3.8 Analisi dei campioni di microdializzato

I campioni di microdializzato raccolti durante l'esperimento, sono stati analizzati con due diversi sistemi per valutare le variazioni delle concentrazioni delle sostanze in esame. I sistemi analitici utilizzati sono uno cromatografico e l'altro spettrofotometrico.

Analisi cromatografica

La quantificazione neurochimica delle catecolamine, indolamine, acido ascorbico e acido urico utilizzata come indice della lesione indotta da MPTP, è stata eseguita mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni con rilevazione elettrochimica (high performance liquid chromatography with electrochemical detection, HPLC-EC). È stata utilizzata una pompa Varian 9001 HPLC dotata di un iniettore Rheodyne (mod. 7725), una colonna a fase inversa (Adsorbosphere C18, 100 mm × 4.6 mm i.d., particle size: 3 μm) (Alltech, USA), un detector elettrochimico BAS mod. LC4B. I cromatogrammi sono stati acquisiti tramite interfaccia Varian Star Chromatographic Workstation v. 4.0 per l'elaborazione e il calcolo.

Analisi spettrofotometrica

La quantificazione dei metaboliti energetici è stata eseguita utilizzando il dispositivo ISCUS (Clinical Microdialysis Analyzer, CMA/Microdialysis Sweden) (Fig.17).



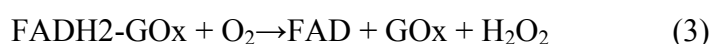
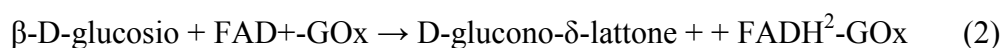
Figura 17: ISCUS/CMA

Si tratta di un sistema di analisi spettrofotometrica, in grado di determinare le concentrazioni di glucosio, lattato, piruvato e i rapporti L/P e L/G in campioni microdializzati di piccolo volume (12 μ l).

I substrati energetici sono ossidati da un enzima della classe delle ossidasi (glucosio ossidasi, lattato ossidasi e piruvato ossidasi) in un sottoprodotto e perossido di idrogeno. Un secondo enzima, la perossidasi (POD) catalizza la reazione colorimetrica tra il perossido di idrogeno formatosi, un reagente specifico per ogni analita (phenol, 4-chloro-phenol, TOOS) e il 4-amino-antipyrine (4-AA) producendo il quinoneimine, un composto colorato rosso/viola. L'assorbanza del composto colorato è letta a una lunghezza d'onda di 530 nm e confrontata con uno standard per determinare la concentrazione di glucosio, lattato e piruvato nel dializzato.

3.9 Biosensore per il glucosio

La quantificazione del glucosio è possibile attraverso l'utilizzo di un enzima specifico: la Glucosio Ossidasi (GOx), immobilizzata sulla superficie di un elettrodo di Platino (Pt) che funge da trasduttore. Alla GOx si lega covalentemente un cofattore: la Flavina Adenina Dinucleotide (FAD) (Serra et al., 2007). L'alta stabilità e specificità della GOx la rende utile nella costruzione del biosensore quando è immobilizzata sulla superficie dell'elettrodo di Platino attraverso l'elettrosintesi della poli-o-fenilendiammina (OPD) sulla superficie del biosensore avvengono le seguenti reazioni:



Il disegno del biosensore per il glucosio, è stato descritto in dettaglio in una precedente pubblicazione (Serra et al.; 2007) del mio gruppo di ricerca, ed è stato modificato in relazione al nostro utilizzo. Ottenuto un cilindro di platino della lunghezza di 1 mm tagliando un filo di platino isolato con teflon ($\varnothing = 125\mu\text{m}$, Advent Research Materials, Suffolk, UK), il cilindro è stato posto in un becker riempito con PBS degasato e contenente o-fenilenediammina (OPD, 250 mM) in forma monometrica. L'elettrosintesi della poli-o-fenilenediammina (p-OPD) è stata realizzata applicando un potenziale di + 700 mV contro un RE Ag/AgCl per trenta minuti. Dopo l'elettropolimerizzazione è stato costruito il biosensore.

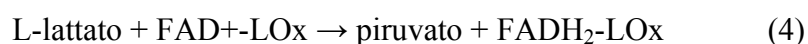
Il cilindro polimerizzato è immerso per cinque volte a intervalli regolari di cinque minuti in una soluzione di uno stabilizzante enzimatico di polietilenimmina (PEI, 1% in acqua) e in una soluzione GOx (50 U/50 μl PBS) e per consentirne l'adsorbimento. Con lo scopo di aumentare la KM del biosensore, è stata applicata una membrana capace di ridurre la diffusione del substrato (Schuvailo et al.; 2006). Tale membrana è stata ottenuta immergendo lentamente il sensore [Pt/(PEI+GOx)] in una soluzione di poliuretano (PU 1% in tetraidrofurano). Per permettere al solvente di evaporare è stato mantenuto a temperatura ambiente per trenta minuti, e sin seguito conservato alla temperatura di + 4 °C

Le calibrazioni in-vitro del biosensore per il glucosio sono state realizzate in PBS in cui è stata fatta gorgogliare dell'aria per 30', attraverso una successione di dieci

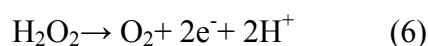
iniezioni di glucosio (0.2, 0.4, 0.6, 1, 2, 10, 20, 60, 100, 140 mM). I dati ottenuti dalla calibrazione sono in accordo con l'equazione di Michaelis-Menten ($r^2 = 0.984$, $n = 6$) con una V_{MAX} pari a $59 \pm 0.6 \text{ nA}$ e una K_M di $5.6 \pm 0.4 \text{ mM}$. La risposta del biosensore alle basse concentrazioni di glucosio (0-2 mM;), rivela un'eccellente linearità ($r^2 = 0.999$, $n = 6$) e uno slope di $8.9 \pm 0.08 \text{ nA mM}^{-1}$.

3.10 Biosensore per il lattato

Il lattato è ossidato dalla lattato ossidasi (LOx). Come la GOx anche LOx è legato covalentemente al cofattore FAD (Serra et al., 2007). Dopo l'ossidazione del substrato un'ulteriore ossidazione del FADH_2 a FAD^+ produce H_2O_2 in presenza di O_2 .



L'applicazione di un potenziale positivo (+ 700mV verso un ER in Ag/AgCl) a un elettrodo di lavoro in platino, genera una corrente proporzionale alla concentrazione di perossido di idrogeno:



in cui la quantità di corrente prodotta è proporzionale alla quantità di substrato (Lat e Glu) trasformati dai rispettivi enzimi LOx e GOx.

La costruzione dei biosensori per il lattato è stata realizzata sulla procedura precedentemente descritta per il glucosio; un cilindro di platino (1 mm) è stato immerso in una cella elettrochimica contenente PBS (degasato con azoto) e il monomero OPD. Il cilindro Pt/p-OPD è stato rapidamente immerso e ritratto (quick dip), in una soluzione di polietilenimmina (PEI, 0.5% in acqua) e LOx (25 U/50 μl PBS) per consentire l'adsorbimento dell'enzima sulla superficie del platino. Dopo cinque minuti a temperatura ambiente, il processo di quick dip è stato ripetuto per altre quattro volte. Anche in questo caso è stata applicata una sottile membrana è stata ottenuta immergendo lentamente il sensore [Pt/(PEI+LOx)] in una soluzione di poliuretano (PU 2,5% in tetraidrofurano). In fine, il biosensore è stato conservato in frigorifero fino all'utilizzo.

Per gli esperimenti, in-vitro e in-vivo, è stata usata l'Amperometria a potenziale costante (CPA) fissando il potenziale di ossidazione per il perossido d'idrogeno a + 700 mV (Serra et al.; 2007) contro un RE Ag/AgCl. Tutte le calibrazioni in-vitro sono state realizzate in PBS fresco 24 ore dopo la costruzione del biosensore come descritto, in dettaglio, precedentemente (Rocchitta et al; 2007).

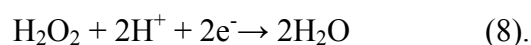
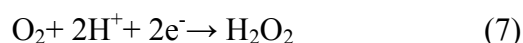
La risposta in-vitro del biosensore per il lattato è stata determinata poco prima dell'impianto, aggiungendo concentrazioni note di lattato nella cella elettrochimica. Le concentrazioni della molecola erano comprese tra 0 e 150 mM.

Le calibrazioni hanno mostrato una cinetica corrispondente alla classica equazione di Michaelis-Menten ($r^2 = 0.944$, $n = 6$) con una V_{MAX} e K_M corrispondenti rispettivamente a 92.8 ± 2 nA e 8.7 ± 0.9 mM. La regione lineare, valutata alle basse concentrazioni (0-5 mM), è stata buona ($r^2 = 0.997$, $n = 6$) e uno slope di 6.7 ± 0.2 nA mM⁻¹

Non sono stati osservati segnali provenienti da interferenti esponendo i biosensori ad AA o altre molecole elettroattive presenti nel fluido extracellulare striatale, anche ad alte concentrazioni (Calia et al.; 2009).

3.11 Microsensore per l'ossigeno

La riduzione elettrochimica dell'ossigeno è ottenuta amperometricamente attraverso complesse trasformazioni che avvengono sulla superficie di un sensore di carbon-epoxy ad un potenziale di -400 mV rispetto ad un elettrodo di riferimento (RE) in argento/cloruro d'argento (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009), come segue:



La costruzione del microsensore per l'ossigeno e la sua calibrazione è stata realizzata come descritto in precedenza per i biosensori (Bazzu et al.; 2009; Calia et al.; 2009). Un filo di argento lungo 1 mm ($\varnothing = 125 \mu\text{m}$, Advent Reserarch Materials, Suffolk, UK) è stato inserito all'interno di un capillare di vetro (10 mm di lunghezza; I.D. $\varnothing = 180\mu\text{m}$ Polymicro Technologies, Phoenix, USA), quest'ultimo è stato riempito parzialmente con colla epossidica caricata al carbone (EC) ottenuta miscelando 450

mg di grafite con 350 mg di resina (Araldite- M[®], Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Il disco che costituisce l'elettrodo di EC ha un diametro di 180 μm . Una volta realizzato è stato messo per 12 ore in stufa a 60° C. Infine il microsensore è stato modificato mediante l'uso di un trapanino elettrico (Dremel) dandogli una forma conica.

I microsensibili finali per la detection dell'ossigeno hanno una lunghezza di circa 250 μm ed una superficie di 0.00145 cm^2 con una punta inferiore a 25 μm . Un sottile strato di nitrocellulosa (NC, collodio) è stato sovrapposto attraverso l'immersione dei sensori in una soluzione di collodio (4% nitrocellulosa in etanolo/dietiletere) per tre volte. A seguito di ciascuna immersione, il sensore era lasciato asciugare a 40° C per un'ora. Questo sottile strato molto idrofobico, costituisce una barriera per grandi molecole organiche come le proteine, frenandole e evitando che la superficie si sporchi; però ciò non blocca le piccole molecole come gli ioni o i gas (Bazzu et al.; 2009). Il potenziale di riduzione per l'ossigeno, è stato determinato sperimentalmente in uno studio precedente (Bazzu et al.; 2009) utilizzando la voltammetria ciclica e fissato a - 400mV rispetto ad un elettrodo di riferimento in Ag/AgCl. Per gli esperimenti e le calibrazioni in-vitro ed in-vivo, è stata usata la tecnica voltammetrica CPA (Amperometria a Potenziale Costante). Non sono state rilevate significative interferenze a molecole elettroattive presenti nel compartimento extracellulare striatale, quali acido ascorbico (500 μM), DOPAC (10 μM), acido urico (10 μM), dopamina (1 μM), (Calia et al.; 2009). Il microsensore per l'ossigeno è stato calibrato aggiungendo volumi noti di soluzioni standard di O₂ al 100% a PBS precedentemente degasato con azoto (N₂).

I sensori che sono stati scelti hanno avuto una sensibilità inferiore a 10 μM . Per il microsensore per l'O₂ dopo 24 ore dalla loro costruzione, è stato applicato un potenziale costante di -400 mV vs un RE in Ag/AgCl e sono state eseguite 5 successive iniezioni (+200, +204, +208, +212, e +216 μL) di una soluzione 1.25 mM O₂ (PBS/100% O₂).

Hanno mostrato una ottima linearità ($r^2 = 0.999$; $n=6$) nel range di concentrazioni studiato (25-125 μM) con uno slope rispettivamente di $-254 \pm 32 \text{ pA } \mu\text{M}^{-1}$ di O₂ (Serra et al.; 2007; Rocchitta et al.; 2007; Bazzu et al.; 2009; Calia et al.; 2009).



Figura 18: Device biotelemetrico impiantato in un ratto libero di muoversi.

3.12 Sensore di movimento

Il sensore utilizzato in questo studio (mod. MVS0608.02; Sensolute Karlsruhe, Germania) per il movimento omnidirezionale a micro-vibrazioni (MVS), ha sensibilità indipendente dal sensore di orientamento, ed è adatto per il rilevamento del movimento. La registrazione del movimento e delle vibrazioni avviene attraverso una placca in oro, su cui si muove microsfera MVS. Questa microsfera (con un diametro di 0,8 mm) si trova all'interno di un cilindro cavo dorato (Fig. 19 B) in cui può muoversi liberamente. Anche il più piccolo movimento o vibrazione provoca il movimento della pallina quando è impressa una accelerazione inerziale di oltre 50 mg. Gli impulsi risultanti sono stati valutati dallo sviluppo di una applicazione specifica elettronica (Fig. 19 A). Grazie alle sue piccole dimensioni (2,85 x 2,45 x 1,7 mm), la MVS è adatta per l'impiego in piccoli dispositivi elettronici. Le MVS è stata direttamente saldata sulla superficie della tavola Z430-RF2500 dopo la rimozione del pulsante originale (Figura 19 A). Tutte le resistenze erano di precisione in metallo spesso pellicola di ossido (250 mW, 0,1% di tolleranza, Ohmite, Rolling Meadows, IL). Tutti i condensatori sono di tipo NP0-(filtro passa-basso) in ceramica multistrato. I componenti sono stati saldati sulle schede elettriche duplice collaterali prodotti come precedentemente descritto. Tutti i componenti elettronici utilizzati in questo progetto sono senza piombo e conformi alle direttive RoHS. A 240 mA h, 3 V batteria al litio moneta (Energizer CR2032) a condizione che la potenza al dispositivo di bio-telemetrico per un massimo di una settimana in trasmissione continua (1 Hz).

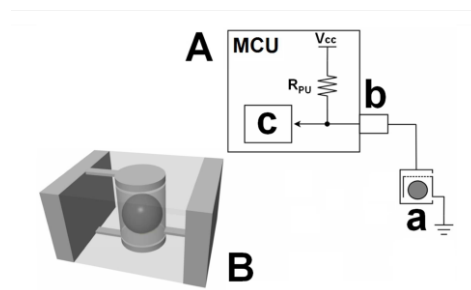


Figura 19: (A) Rappresentazione schematica dei collegamenti tra il sensore a Microvibrazione (MVS) e l'unità microcontrollore. (B) Disegno 3D del MVS (mod Sensolute. MVS0608.02)

3.13 Il Sistema Telemetrico

Il circuito elettronico per l'apparecchio telemetrico impiantabile, è stato realizzato utilizzando componenti a montaggio superficiale fornite Farnell-In-One spa (Milano, Italia), si compone di due parti diverse: il modulo amperometrico ed il modulo comprendente il microcontrollore ed il sistema ricetrasmittente (Fig. 20).

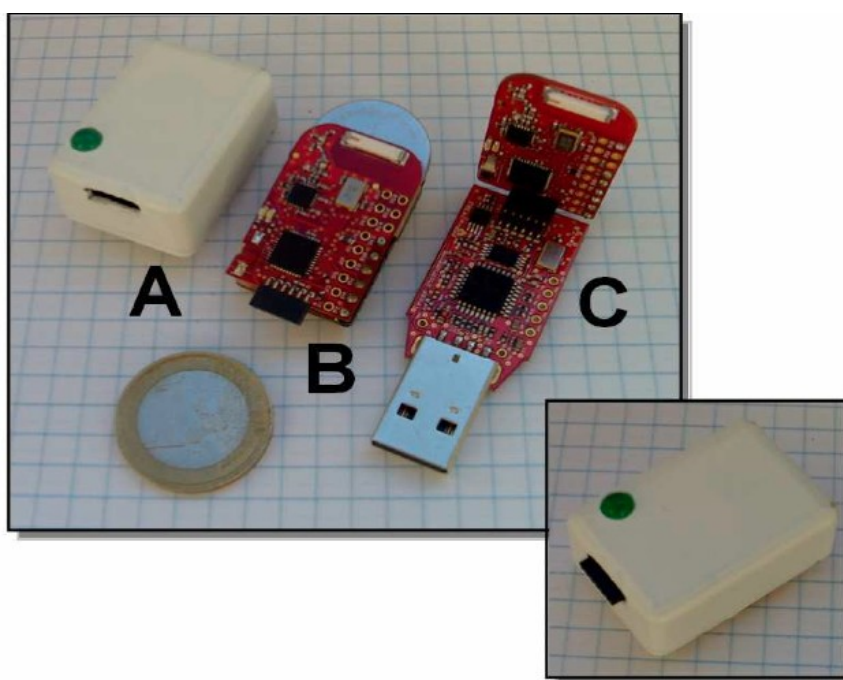


Figura 20: Sistema di biotelemetria sviluppato e utilizzato nel corso di questo studio

Come semplificato nelle figure 12 e 13, la sezione amperometrica del dispositivo bio-telemetrico è stata realizzata utilizzando un amplificatore operazionale quadruplo MPC6044 (Arizona Microchip, Chandler, Stati Uniti d'America) ad un diodo Zener ZXRE4001 (Zetex, Manchester, UK), due resistenze, un potenziometro ed un condensatore su una piastra delle dimensioni di 28 mm x 17mm. (Fig. 20, A e B). L'MCP6044 è stato disegnato per applicazioni in micro potenza e può operare a singola alimentazione ("rail-to-rail" sia in ingresso sia in uscita). Garantisce una bassa corrente di polarizzazione (1 pA) con un consumo di soli 600 nA per OPA ed una resistenza in ingresso estremamente alta ($>10^{13} \Omega$).

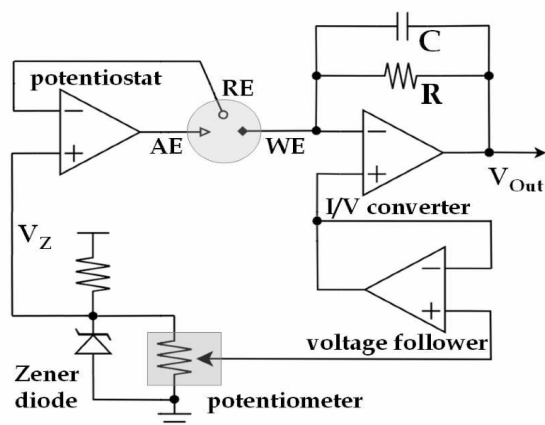


Figura 21: Schema del modulo amperometrico del dispositivo biotelemetrico che lavora in "modalità di riduzione".

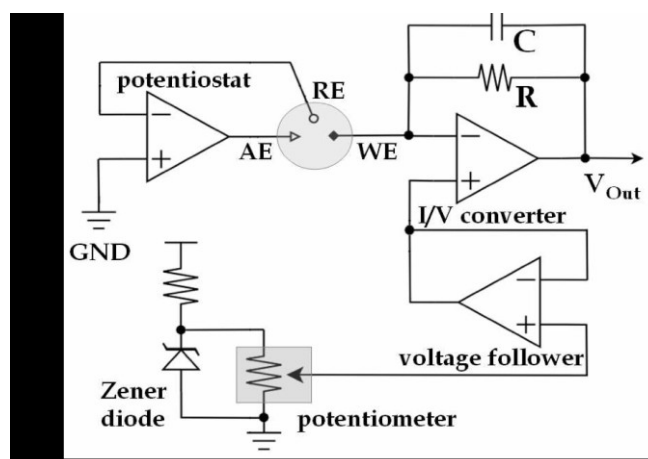


Figura 22: Schema del modulo amperometrico del dispositivo biotelemetrico che lavora in "modalità ossidazione".

Il diodo Zener ha un ruolo cardine nella circuiteria amperometrica. Lo Zener impiegato come voltaggio di riferimento, genera un voltaggio fisso $V_Z = 1.22$ V, consumando circa $10 \mu\text{A}$, con una resistenza limite di 150 K posta tra l'alimentazione e lo Zener stesso. Come avviene per il microsensore dell'ossigeno l'ingresso non invertente del potenziostato è stato connesso a V_Z per lavorare con un microsensore in riduzione (Bazzu et al.; 2009) (Fig. 21).

L'input del potenziostato precedentemente indicato è stato collegato alla massa (GND) lavorando in ossidazione, pertanto il potenziale applicato alla WE è positivo, sempre rispetto alla massa, con un range che va da GND a Vz (1.22 V).

L'ingresso invertente del potenziostato è stato direttamente connesso allo RE mentre la sua uscita cablata direttamente all'elettrodo ausiliario. Il circuito di feedback in cui RE e AE sono mantenuti allo stesso potenziale è implementato dallo stesso ingresso non invertente (definito circuito potenziostatico). Il potenziometro e un inseguitore di tensione costituisce il divisore di voltaggio bufferizzato, genera il potenziale necessario per polarizzare l'WE in un range compreso tra 0 e 1.22V (Vz controllato dallo Zener ZXRE4001). Un adattamento in singola alimentazione di un classico amplificatore in transimpedenza è il convertitore corrente tensione (I/V) è che deriva da un disegno precedentemente pubblicato (Serra et al.; 2007; Rocchitta et al.; 2007). La funzione di trasferimento corrente tensione è la seguente:

$$V_{Out} = - (I_{redox} \cdot R) + V_{App} \quad (9)$$

dove I_{redox} è la corrente di ossidoriduzione che fluisce attraverso WE; R è la resistenza di feedback; V_{App} è il potenziale applicato all'WE (rispetto alla massa). Lavorando in riduzione per esempio, una corrente di 0 μ A corrisponde al potenziale applicato V_{App} (0.8, ossia - 0.4 V rispetto a Vz) mentre con una corrente catodica di -30 nA, V_{Out} corrisponde a 0.5 V ($R = 10 \text{ M}\Omega$). Per cui la corrente massima consentita è circa -80 nA con un risultante V_{Out} di 0 V. All' opposto, in un sistema che lavora in ossidazione, una corrente anodica massima di 18 nA può essere letta senza che il sistema vada in saturazione; quindi avremo il potenziale applicato V_{App} a 0.7 V con una uscita V_{Out} di 2.5 V ed una resistenza di feedback (R) in cui la resistenza di cut-off ($F_{cut-off}$) è di 5Hz. Il valore di C è stato calcolato in Farad in accordo con l'equazione:

$$C = 1 / (F_{cut-off} \cdot 2\pi \cdot R) \quad (10).$$

Per verificare il modulo amperometrico della device biotelemetrica prima della calibrazione dei sensori, è stata utilizzata una dummy cell realizzata in base a disegni precedenti pubblicati (Serra et al.; 2007). L'intenzione è stata quella di simulare la risposta amperometrica costante di una cella elettrochimica reale usando una sorgente di corrente di Thevenin che la riproduce. Attraverso la connessione dell'WE

e degli elettrodi di RE/AE è stato generato il voltaggio applicato alla dummy cell che è uguale alla differenza di potenziale tra i succitati elettrodi.

Le correnti risultanti pertanto sono state trasformate in un voltaggio di uscita (VOut) come è stato precedentemente spiegato. Dalla calibrazione elettronica i dati ottenuti sono analoghi a quelli ottenuti negli studi precedenti (Bazzu et al.; 2009; Calia et al.; 2009). L'integrato MSP430F2274 della Texas Instruments (TI) è il cuore del modulo digitale. Questo è un circuito integrato (IC) a 16 bit realizzato in complementary mos (CMOS) con caratteristiche di consumo di potenze ultra basse equipaggiato con convertitori analogici digitali (ADC) a 10 bit. La conversione analogico digitale A/D è creata dall'unità microcontrollore (MCU) dei segnali VOut, VBatt, VApp e monitorizza la temperatura all'interno del chip utilizzando un riferimento interno di 2.5 V.

I dati grezzi acquisiti con il processo digitale del segnale (DSP), generano un pacchetto di dati seriale e viene mandato al transceiver (TI): il TI è composto da un CC2500 multi canale disegnato per applicazioni wireless a bassa potenza sulla banda di 2.4 GHz. Al transceiver CC2500 sono stati connessi alcuni pin del microcontrollore che compongono la linea dati del transceiver stesso. Questo componente ibrido insieme al microprocessore (MCU) consente la realizzazione di un trasmettitore di dati seriali che lavora alla velocità di 9600 baud.

Nella piastra PCB è stata integrata un'antenna chip miniaturizzata nella quale sono stati saldati tutti i componenti. In pochi secondi il bus ICSP, quello che garantisce la programmazione seriale del circuito, consente di programmare il microprocessore (MCU) "on-board". E' disponibile già pre-assemblato dalla TI (eZ430-RF2500) il modulo digitale (Fig. 22B e Fig. 22C).

L'unità biotelemetrica è alimentata per una settimana da una batteria "a bottone" Maxell ER2032 in litio da 3V, con una capacità di 210 mA/h, in trasmissione continua alla frequenza di 1 Hz. Un piccolo contenitore plastico (3.2 x 2.1 x 1.4 mm;) completa il device impiantabile (Fig. 20, riquadro)

Il peso complessivo (inclusa la batteria) dell'unità impiantabile è di 12.4 g. Ad un personal computer (PC) attraverso un programmatore USB è connesso un secondo modulo digitale (Fig. 20 C), con la funzione di accoppiare le unità biotelemetriche impiantabili con il software che gira su PC (Fig.23).

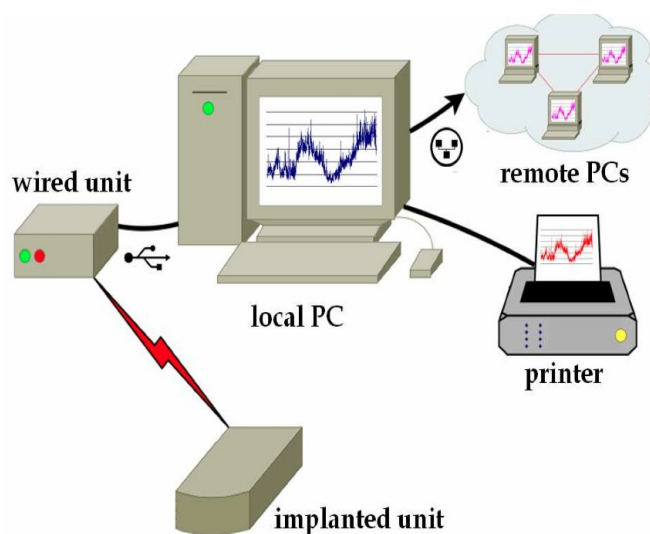


Figura 23: Immagine schematica del sistema biotelemetrico

Firmware e software

Con il linguaggio C utilizzando IAR Embedded Workbench nella versione 5.2 disponibile gratuitamente nel sito www.ti.com è stato realizzato il firmware che pilota i microprocessori MSP430F2274 (unità periferica ed unità collegata all'USB del PC).

Il programma, che consiste fondamentalmente di due routine gira nell'unità biotelemetrica impiantabile: la routine principale e quella basata sul timer-interrupt che viene richiamata ogni secondo come illustrato nella figura 24. Quando Vout, il segnale analogo, è digitalizzato, è incrementata da 10 bit la risoluzione di ADC (convertitore analogico digitale) utilizzando un metodo di sovra campionamento e decimazione (Pagnacco et al.; 1997):

$$Fos = 4w \cdot Fs \quad (11)$$

in cui w è il numero di bit aggiuntivi di risoluzione (2); Fs la frequenza di campionamento (1Hz); Fos la frequenza di sovracampionamento.

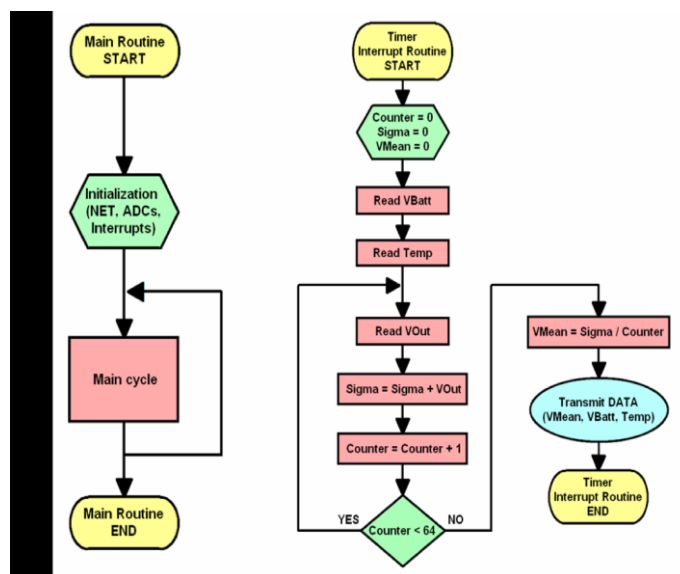


Figura 24: Firmware in esecuzione sul dispositivo impiantabile biotelemetrico

In accordo con il teorema di Nyquist, F_s può essere calcolato come segue:

$$F_s = 2 \cdot F_{max} \quad (12)$$

in cui F_{max} è stata fissata a 2 Hz. Il microprocessore MCU perciò acquisisce ed accumula 64 campioni consecutivi e divide il risultato per 26 (Fig. 25). In questo modo aumenta da 10 a 12 bit la risoluzione dei convertitori analogico digitali (ADC). I dati trasmessi in radiofrequenza (RF, 1 al secondo), sono stati incapsulati in un protocollo di trasmissione (SimpliciTI™), implementato dalla Texas Instruments per lo sviluppo di reti wireless (NETs) di bassa potenza. Lo stesso canale di trasmissione può essere condiviso con a 100 unità impiantabili, ognuna delle quali ha un indirizzo di 8 bit memorizzabili all'interno della memoria E2PROM. Un secondo microprocessore MSP430F2274 è montato su la routine interrupt-driven del ricevitore, e comunica con un PC usando una porta USB e filtra i dati sia in ingresso sia in uscita (IN-OUT).

Utilizzando un programma USB della TI collegato al bus ICSP è stato trasferito il firmware ai due microcontrollori (Fig. 25). Il software che gira nel PC sotto Windows XP Professional™ o Vista™, comunica attraverso la USB usando un driver a basso livello reso disponibile liberamente nel sito www.ti.com.

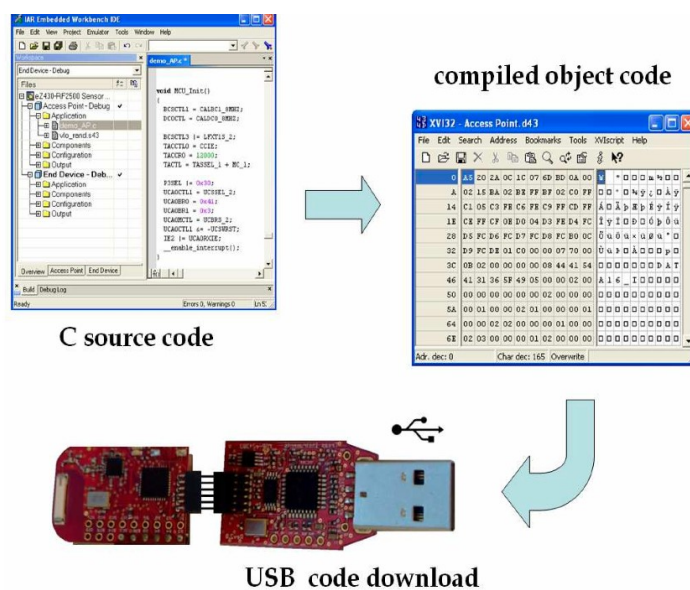


Figura 25: Programma di MSP430F2274 consistente sulla modifica del ciclo compilato download.

E' stata sviluppata utilizzando il software Profilab Expert® (versione 4.0 da Abacom) l'interfaccia grafica (Fig. 26) mentre sono state programmate in C utilizzando il compilatore DEV-C++ versione 4.9.9.2, le librerie a link dinamico (DLL) all'interno delle quali ci sono le routine di serial-data-parser. L'applicazione (capace di plottare, memorizzare e mostrare i dati), permette l'interfacciamento del sistema con la stampante attraverso la porta USB, con una LAN (Local Area Network) o tramite internet via TCP/IP (Fig. 23).



Figura 26: Semplice dell'interfaccia grafica del software di acquisizione dati in esecuzione sul PC.

Viene generato un allarme dal software quando il voltaggio della batteria scende di sotto ai 2.7 V ($VBatt < 2.7$), quando è troppo bassa la potenza del segnale di trasmissione RSSI oppure non c'è più la trasmissione di dati legata ad un'eccessiva distanza dell'unità periferica rispetto all'unità centrale.

3.14 Istologia

Trascorsi sette giorni dall'ultima somministrazione di MPTP, i ratti sono stati sacrificati con una overdose di cloralio idrato (800 mg / kg i.p.) e sono stati espianati i cervelli. Questi ultimi sono stati divisi in due porzioni: una anteriore, contenente lo *Striatum*, e una posteriore contenente sia *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc). La parte anteriore è stato fissato in 10% di una soluzione di formalina e le sono state fatte al criostato, sezioni coronali di 50 μ m. Le fette sono state colorate con cresyl violetto ed esaminati al microscopio per confermare la giusta posizione di ogni sonda da microdialisi. La parte posteriore trattata con Snap è stata congelata in un bagno secco ghiaccio/isopentano e conservato a -80°C. Per la Tirosina idrossilasi l'immunoistochimica è stata effettuata su sezioni coronali in serie di 9 μ m tagliate al criostato da ogni SNpc. Le sezioni sono state fissate e disidratate in metanolo per 20 minuti a -20 ° C e poi incubate con 0,3% H₂O₂ per 20 minuti per inattivare l'attività perossidasi endogena. I siti di legame non specifici sono stati bloccati con l'incubazione in siero di capra per 20 minuti di. Le fettine sono state poi incubate con un anticorpo anti-topo TH (Clone TH16, Sigma, 1:4000) per 1 ora a temperatura ambiente, seguito da risciacqui con PBS per 15 min e incubazione con una perossidasi coniugata a un anticorpo secondario anti-topo (ImmPress REAGENT Anti-Mouse IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Le sezioni sono state poi trattate con 3,3-diaminobenzidina per visualizzare le cellule TH-positivi.

3.15 Analisi statistica

Le concentrazioni degli analiti nel dializzato sono state espresse in nM (DA), pM (DOPAC e piruvato) o mM (glucosio e lattato) ed espressi come media \pm SEM. I rapporti L/P e L/G sono stati dati come valori privi di unità di misura. Gli effetti dei farmaci sulle sostanze neurochimiche sono stati valutati statisticamente, in termini di variazioni nelle concentrazioni dializzato assolute. Gli effetti di MPTP e pargilina sul metabolismo energetico sono stati studiati in termini di variazioni di area sotto la curva (AUC) \pm SEM. L'AUC è stata calcolata a 40 minuti (tempo in cui si ha la

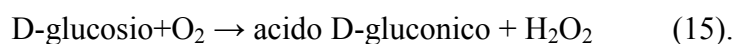
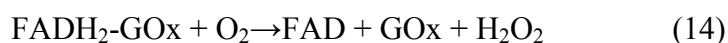
somministrazione di MPTP intraperitoneo) e a 220 minuti (tempo in cui l'esperimento ha termine).

La significatività statistica all'interno dei gruppi per le differenze nel tempo è stata valutata utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA), mentre le differenze statistiche tra i gruppi sono state determinate con t-test, con la regolazione comparazione multipla Newman-Keuls. I valori di P pari o inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi .

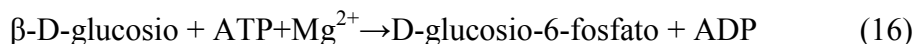
3.16 Biosensore per l'ATP

Il biosensore per l'ATP è stato realizzato partendo dal modello precedentemente descritto per il glucosio e per il lattato. Il biosensore è costituito dall'associazione di due enzimi: la GOx e la HEx. Entrambi gli enzimi utilizzano il medesimo substrato il glucosio; le reazioni sono le seguenti:

per la GOx:



per la HEx:



la HEx in presenza di ATP converte il glucosio in glucosio-6-fosfato quindi la riduzione della corrente generata per l'idrolisi dell'H₂O₂ a potenziale di +700 mV dalla GOx è direttamente proporzionale alla quantità di ATP utilizzata per sottrarre il glucosio alla GOx e esser convertito dalla HEx in glucosio-6-fosfato

Un cilindro di platino (1 mm) è stato immerso in una cella elettrochimica contenente PBS ed il monomero OPD. Inizialmente ci siamo focalizzati sull'immobilizzazione di entrambi gli enzimi sul cilindro di platino utilizzando la medesima procedura: il cilindro Pt/p-OPD è stato introdotto, in una soluzione di polietilenimmina (PEI, 1% in acqua) e GOx (50 U/50 µl PBS)/ HEx (100U/50 µl PBS) per cinque volte, e infine è stato sovrapposto un sottile film di poliuretano (PU 1%). Dopo la costruzione il biosensore è stato conservato in frigorifero a 4°C e calibrato nelle successive 24 ore. Non abbiamo ottenuto risultati soddisfacenti perché il nostro biosensore non funzionava dopo le 24 ore dalla sua costruzione e pur riducendo il tempo di attesa per la calibrazione la sua funzionalità non andava oltre le 4-6 ore dalla costruzione. Abbiamo proceduto per tanto costruendo un biosensore in cui gli enzimi non si trovassero immobilizzati sulla superficie di platino. Partendo dal disegno della doppia sonda da microdialisi in vivo (Bazzu et al.; 2011), abbiamo costruito un dispositivo in grado di contenere in entrambe le camere le soluzioni enzimatiche.

Abbiamo inserito all'interno della camera microdialitica un filo di platino isolato con teflon ($\varnothing = 50\mu\text{m}$, Advent Research Materials, Suffolk, UK), liberato un cilindro di 2 mm.

Una volta costruita ciascuna emisonda è stata riempita con la soluzione di enzimi, in una abbiamo inserito la soluzione di GOx (50 U/50 μl PBS) e l'altra una soluzione con la mix di entrambi GOx (50 U/50 μl PBS)/ HEx (100U/50 μl PBS).

Inizialmente abbiamo effettuato una calibrazione per il glucosio per valutare che l'efficienza della GOx venisse mantenuta, abbiamo usato le medesime condizioni sperimentali (0.2, 0.4, 0.6, 1, 2, 10, 20, 60, 100, 140 mM). I dati ottenuti dalla calibrazione sono in accordo con l'equazione di Michaelis-Menten e non mostravano differenze in relazione alle calibrazioni su un biosensore per il glucosio. Abbiamo proceduto poi con la calibrazione di ATP, svolte anche queste in PBS in cui era stato aggiunto in presenza di Mg^{2+} , elemento fondamentale per l'attivazione dell'HEx.

3.17 Biosensore per MAO B

Le MAO B sono enzimi della famiglia delle ossidasi, che catalizzano la conversione delle ammine né corrispondente prodotto aldeidico. Dopo l'ossidazione del substrato un'ulteriore ossidazione del FADH₂ a FAD⁺ produce H₂O₂ in presenza di O₂.



Il disegno del biosensore MAO B, è stato creato e caratterizzato prendendo il via dalle procedure descritte ed è stato modificato in relazione al nostro utilizzo. Anche in questo caso abbiamo ottenuto un cilindro di platino della lunghezza di 1 mm tagliando un filo di platino isolato con teflon ($\varnothing = 125\mu\text{m}$, Advent Research Materials, Suffolk, UK), il cilindro è stato sottoposto a elettrosintesi della poli-o-fenilenediammina (p-OPD) è stata realizzata applicando un potenziale di + 700 mV contro un RE Ag/AgCl per quindici minuti in un becker riempito con PBS degasato e contenente o-fenilenediammina (OPD, 250 mM) in forma monometrica. Dopo l'elettropolimerizzazione è stato costruito il biosensore.

Il cilindro polimerizzato è immerso per dieci volte a intervalli regolari di cinque minuti in una soluzione di uno stabilizzante enzimatico di polietilenimmina (PEI, 1% in acqua) e in una soluzione MAO-B ($\geq 1\text{U/mg}$ proteina) e per consentirne l'adsorbimento sulla superficie del platino.

E' stata applicata una membrana per ridurre la diffusione del substrato di una soluzione di poliuretano (PU 1% in tetraidrofurano) con lo scopo di aumentare la KM del biosensore, (Schuvailo et al.; 2006).

Dopo trenta minuti a temperatura ambiente, per permettere al solvente di evaporare, è stato conservato alla temperatura di + 4 °C. Le calibrazioni in-vitro del biosensore sono state realizzate in PBS in cui è stata fatta gorgogliare dell'aria per 30' o azoto per valutarne l'ossigeno dipendenza; usando specifici substrati con una successione di iniezioni di MPTP, DA e 2-fenilettilammina.

4 Risultati

4.1 L'MPTP produce dei cambi nei livelli basali striatali di DA e DOPAC con o senza pre-trattamento con pargilina

Sono stati raccolti tre campioni durante un'ora di stabilizzazione, prima dell'iniezione della neurotossina. I livelli basali delle specie neurochimiche presenti nello striato sono stati calcolati mediante la media \pm SEM dei dati, ottenuti dagli animali usati in questo studio.

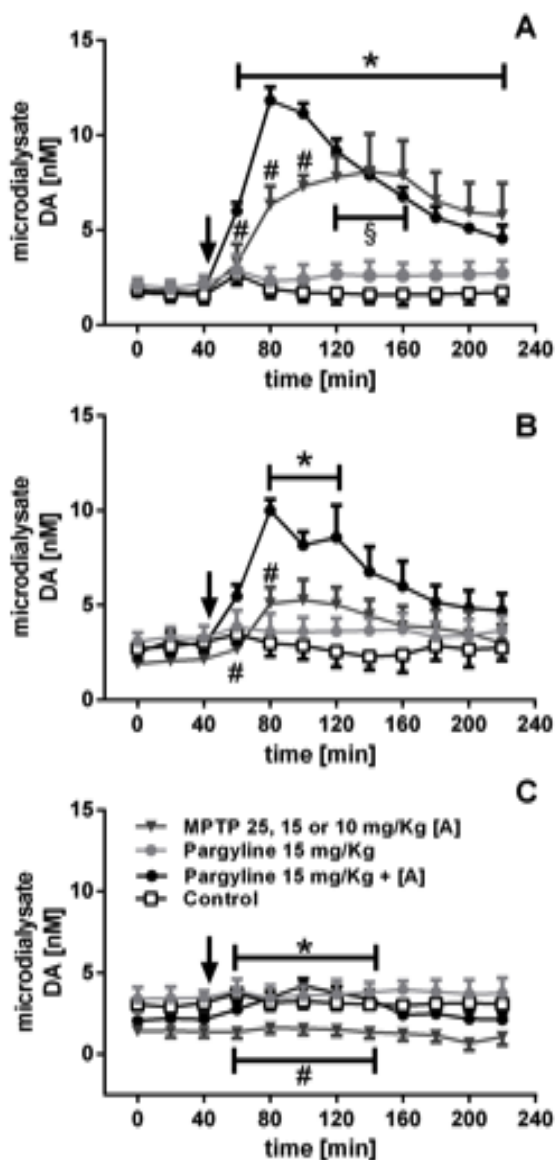


Figura 27: Livelli basali e gli effetti di tre giorni somministrazione di MPTP (25-15-10 mg/kg/2.5 ml i.p. salina) sulle concentrazioni di dopamina nel dializzato.

Al giorno 1 la DA e il DOPAC erano rispettivamente: 1.744 ± 0.048 nM, 1.041 ± 0.001 μ M, (con la sola somministrazione di MPTP senza pretrattamento con pargilina) e 1.707 ± 0.052 nM, 0.71 ± 0.02 μ M (con la somministrazione di MPTP e pretrattamento con pargilina) (Fig. 27 A). Non sono stati trovati valori di NE e L-DOPA nei campioni.

Ai ratti per tre giorni consecutivi è stata somministrata sistematicamente una singola dose di MPTP (25-15-10 mg/Kg i.p.) associata o no al pre-trattamento con pargilina. Il trattamento con MPTP induce un incremento dei livelli basali di DA in entrambi i gruppi, si osserva al giorno 1 dopo 100 minuti dalla somministrazione di MPTP, un aumento massimo del 463% rispetto al valore basale, nei ratti trattati con solo MPTP, e del 693% dal valore basale dopo 40 min nei ratti pre-trattati con pargilina (ANOVA $P < 0,05$) (Fig. 27 A).

Ai giorni 2 e 3, l'MPTP determina nel dializzato una riduzione di DA rispetto al giorno 1 (Fig. 27 B e C), rispetto ai valori basali; rispettivamente, nei ratti trattati con MPTP e negli animali trattati con MPTP e pargilina, del 259% e 116% al giorno 2 e del 354% e 197%, al giorno 3.

Al contrario, l'MPTP porta alla diminuzione dei livelli di DOPAC nel dializzato durante i 3 giorni di trattamento, con una riduzione rispetto alla linea di base fino del -94%, -82% e -78% rispettivamente al giorno 1, giorno 2 e il giorno 3 ($P < 0,05$).

La pre-somministrazione della pargilina, seguita dalla somministrazione di MPTP, ha provocato una diminuzione di DOPAC dei valori basali con un'ulteriore diminuzione (diminuzione massima rispetto alla linea di base fino del -85% al giorno 1, del -73% al giorno 2 e del -61%, al giorno 3), come mostrato in figura 28.

In un gruppo separato di animali, non abbiamo visto alterazioni nei livelli di DA striatale dopo una somministrazione pargilina (15 mg/kg) rispetto al gruppo di controllo (Fig. 28), mentre la sola pargilina induce una diminuzione significativa di DOPAC rispetto ai controlli, ma non evidente rispetto ai valori basali degli animali trattati con MPTP al giorno 2 e al giorno 3 (Fig. 28).

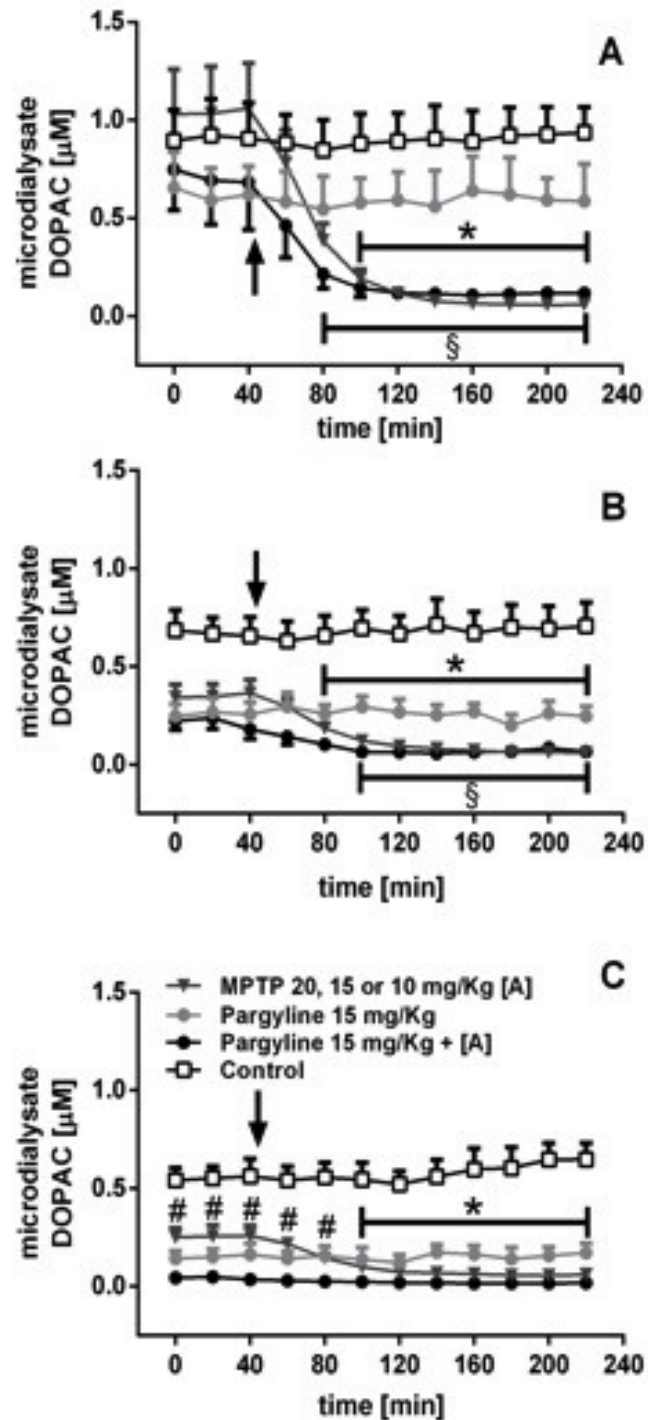


Figura 28: Livelli basali e gli effetti sulle concentrazioni di DOPAC nel dializzato durante la somministrazione di MPTP nei tre giorni

4.2 Effetti della somministrazione di MPTP sui livelli basali nello striato di glucosio, lattato e piruvato con e senza pre-trattamento con pargilina

L'analisi spettrofotometrica dei campioni di dializzato striatale è stata effettuata con lo scopo di studiare le variazioni nei livelli di glucosio (Fig. 29), lattato (Fig. 30) e piruvato (Fig.31) dopo la somministrazione sistemica di MPTP con o senza pretrattamento con la pargilina. Non è stata osservata nessuna differenza per tutti i parametri presi in considerazione tra i ratti trattati con solo con il veicolo o con la sola pargilina. I livelli basali degli analiti striatali implicati nel metabolismo energetico, sono stati calcolati come la media \pm SEM dei dati ottenuti da tre campioni di microdialisi raccolti dopo un periodo di stabilizzazione della durata di 1 ora e prima della somministrazione di MPTP. Si ha una diminuzione statisticamente significativa ($P < 0.05$) dei livelli basali di glucosio, come è stato osservato nel compartimento extracellulare striatale dei ratti trattati con MPTP al giorno 2, 0.600 ± 0.023 mM e 0.136 ± 0.028 mM al giorno 3, rispetto al giorno 1 in cui si aveva 0.868 ± 0.083 mM come mostrato in figura 29 A. Nel gruppo pre-trattato con pargilina, i livelli basali di glucosio al giorno 2 erano 1.011 ± 0.062 mM e non differivano in modo significativo dal giorno 1 nel quale i valori erano 0.981 ± 0.055 mM, mentre è stata osservata al giorno 3 una diminuzione significativa pari a 0.301 ± 0.055 mM rispetto ai giorni precedenti, anche se abbiamo ottenuto una significatività elevata ($P < 0.05$) rispetto ai dati ottenuti allo stesso giorno per i ratti trattati solo con MPTP. Negli animali, trattati solo con pargilina, e anche per il gruppo di controllo, è stato visto che i livelli di glucosio rimangono stabili nei giorni di trattamento; (che vanno dal $0.935 \pm 0,061$ mM per il giorno 1, e 886 ± 0.044 mM per il giorno 3) che variano rispetto al gruppo trattato con MPTP (al giorno 2 e al giorno 3) e per il gruppo pre-trattati con pargilina (al giorno 3). Come illustrato in figura 29 B, la somministrazione della neurotossina ha causato una diminuzione statisticamente significativa ($P < 0.05$) dei valori dell'AUC di glucosio (che vanno da 8.213 ± 0.414 al giorno 1 a 0.886 ± 0.221 al giorno 3) con un decremento massimo del -89.3% al giorno 3 rispetto al giorno 1.

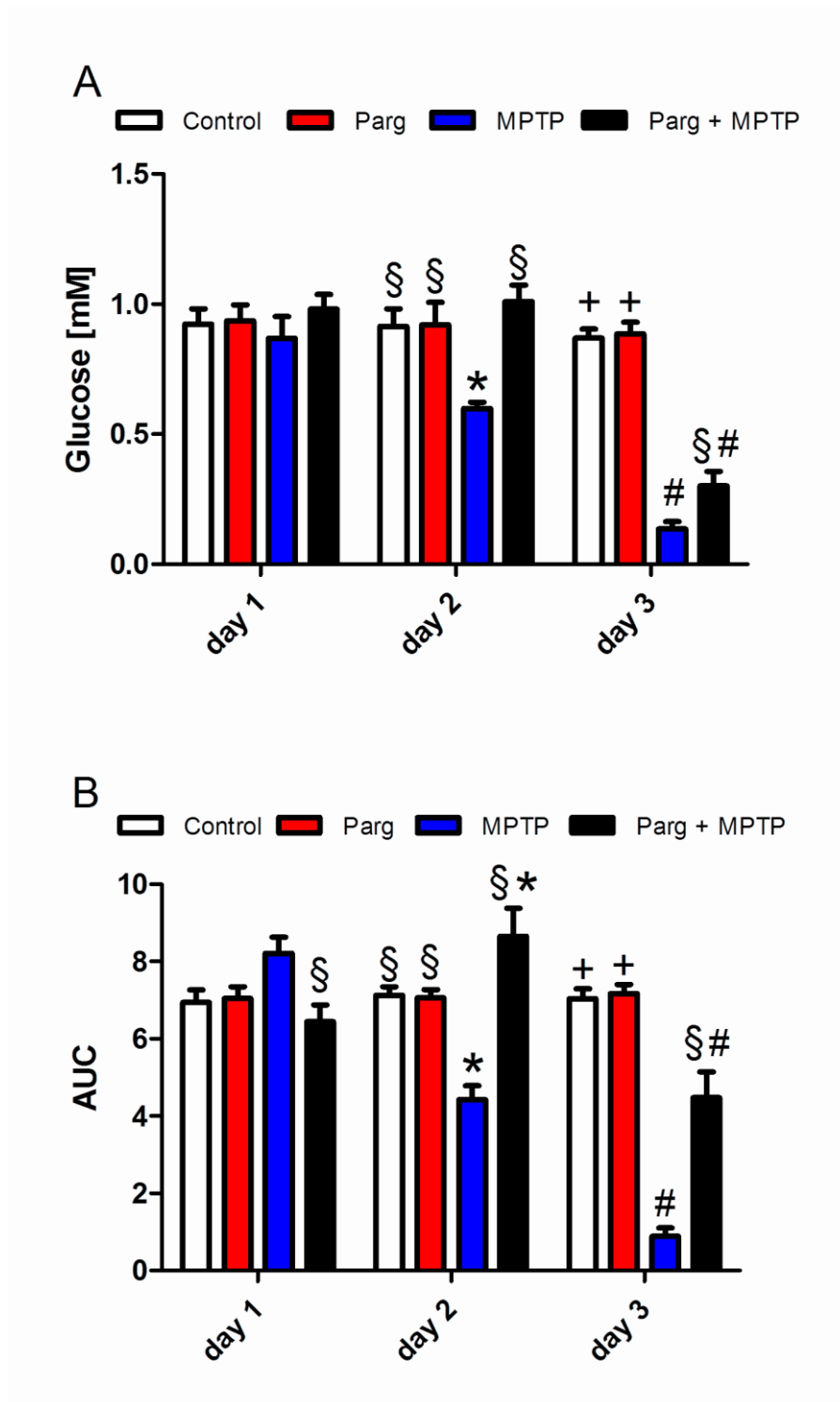


Figura 29: Variazioni dei livelli del glucosio striatale, (A) variazioni a livello basale; (B) AUC delle variazioni a seguito del trattamento con la neurotossina

Anche se statisticamente inferiore rispetto al solo trattamento con pargilina al giorno 3, il pre-trattamento con pargilina ha evidenziato elevati valori nell'AUC di glucosio per il giorno 2 e rispetto al giorno 3 con i ratti trattati solo con l'MPTP ($P < 0.05$). Viceversa, i livelli basali di lattato hanno mostrato un aumento significativo ($P < 0.05$) nello spazio extracellulare striatale per gli animali trattati con l'MPTP sia nel giorno 2 (0.872 ± 0.115 mM) che nel giorno 3 (1.570 ± 0.104 mM) rispetto al giorno 1 in cui avevamo 0.503 ± 0.048 mM. Negli animali che hanno ricevuto il pre-trattamento, solo al giorno 3 hanno un aumento statistico ($p < 0.05$) di lattato; 0.914 ± 0.037 mM rispetto al giorno 1 dove era 0.520 ± 0.072 mM e 0.587 ± 0.032 mM al giorno 2. Al giorno 2 e al giorno 3, i livelli basali di lattato erano inferiori ($P < 0.05$) rispetto al gruppo trattato con MPTP (Fig. 30 A). I livelli basali di lattato nei ratti trattati con la pargilina variava da 0.534 ± 0.065 mM a 0.555 ± 0.056 mM e si è dimostrato statisticamente diverso dal gruppo trattato con solo con la neurotossina MPTP (per il giorno 2 e il per il giorno 3) e il gruppo pretrattato con pargilina e MPTP al giorno 3.

I valori dell'AUC per il lattato, (Fig. 30 B) nel gruppo di animali trattato solo con l'MPTP, non differiva significativamente nei vari giorni di trattamento. Anche se si aveva un progressivo aumento al giorno 2 (5.357 ± 0.407) che si protraeva anche al giorno 3 (6.958 ± 0.251) rispetto al giorno 1 in cui si aveva 4.099 ± 0.566 , nei ratti pre-trattati con la pargilina avevano valori di AUC inferiori rispetto al gruppo trattato con l'MPTP ($P < 0.05$) allo stesso tempo di trattamento.

Non sono state osservate differenze per l'AUC del lattato negli animali trattamenti con pargilina per i vari giorni, ma si avevano valori di AUC statisticamente differenti solo nei ratti pre-trattati con pargilina e con la neurotossina.

Analogamente al glucosio anche se non si osserva significatività, negli animali trattati con solo MPTP, il piruvato ha mostrato una diminuzione dei suoi livelli durante il tutto il tempo di trattamento con la neurotossina (Fig. 31 A). I livelli basali di piruvato erano 76.89 ± 8.55 mM, 63.89 ± 7.53 mM, 45.89 ± 7.22 mM, rispettivamente, al giorno 1, al giorno 2 e al giorno 3. Per il gruppo trattato solo con la pargilina e nel gruppo in cui si aveva il pre-trattamento, i livelli basali di piruvato sono rimasti stabili durante l'esperienza di tre giorni, che vanno da

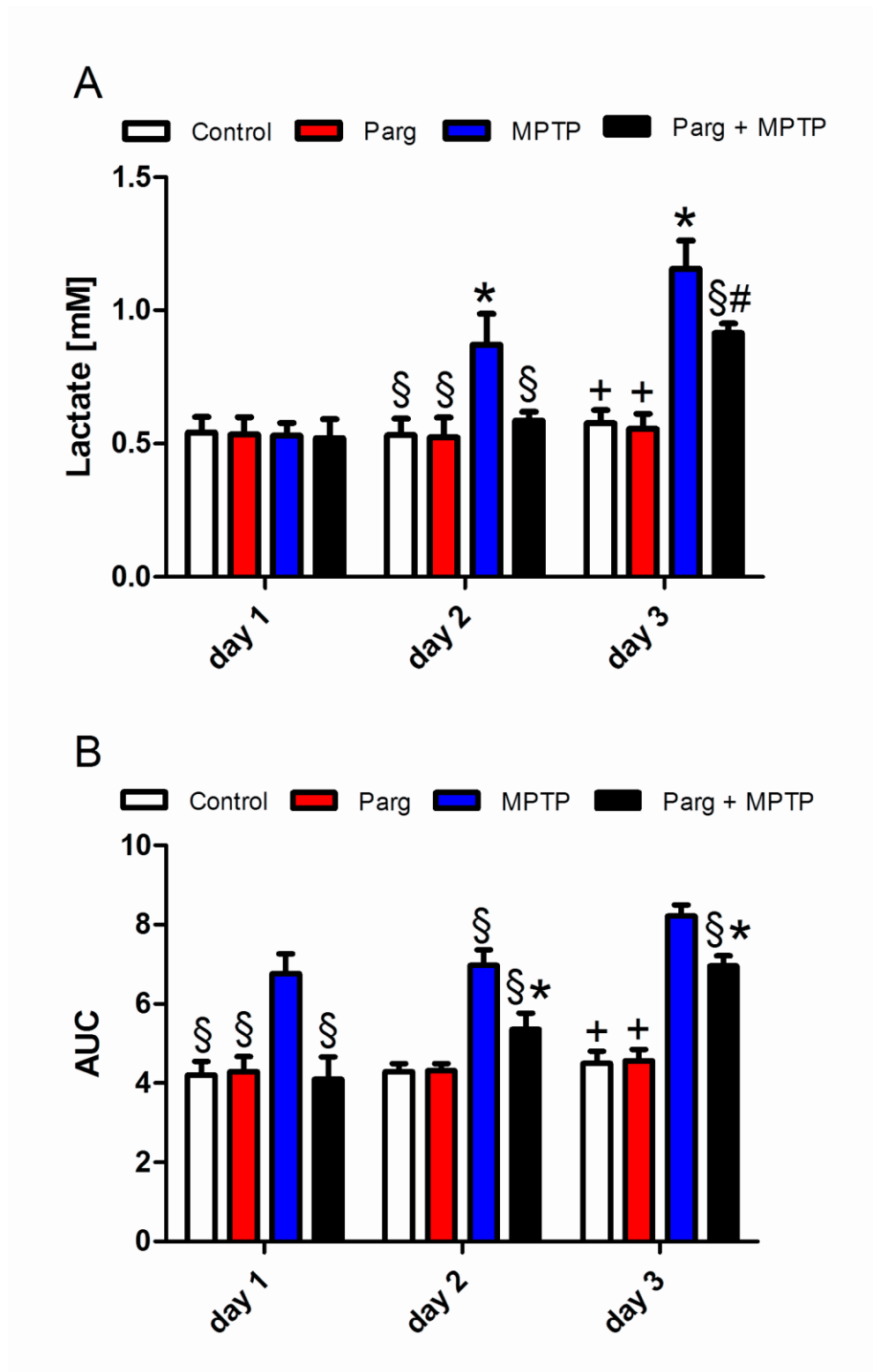


Figura 30: : Variazioni dei livelli del lattato striatale, (A) variazioni a livello basale; (B) AUC delle variazioni a seguito del trattamento con neurotossina

78.49 ± 9.62 mM al giorno 1, e 70.36 ± 8.77 mM al giorno 3 (P <0.05 vs il corrispondente giorno di trattamento con solo MPTP). I ratti trattati solo con l'MPTP, hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa (P <0.05) per i valori dell'AUC di piruvato al giorno 2 (395.5 ± 55.4) e al giorno 3 (190.5 ± 78.3) rispetto ai valori del giorno 1 (717.2 ± 45.8), con un calo del -83.5% registrato al giorno 3. Al contrario, non è stata osservata nessuna diminuzione dei livelli di piruvato né per il gruppo trattato con solo la pargilina né per il gruppo che ha ricevuto il pre-trattamento (p <0.05 vs il corrispondente giorno di trattamento con solo MPTP) come illustrato in figura 31 B.

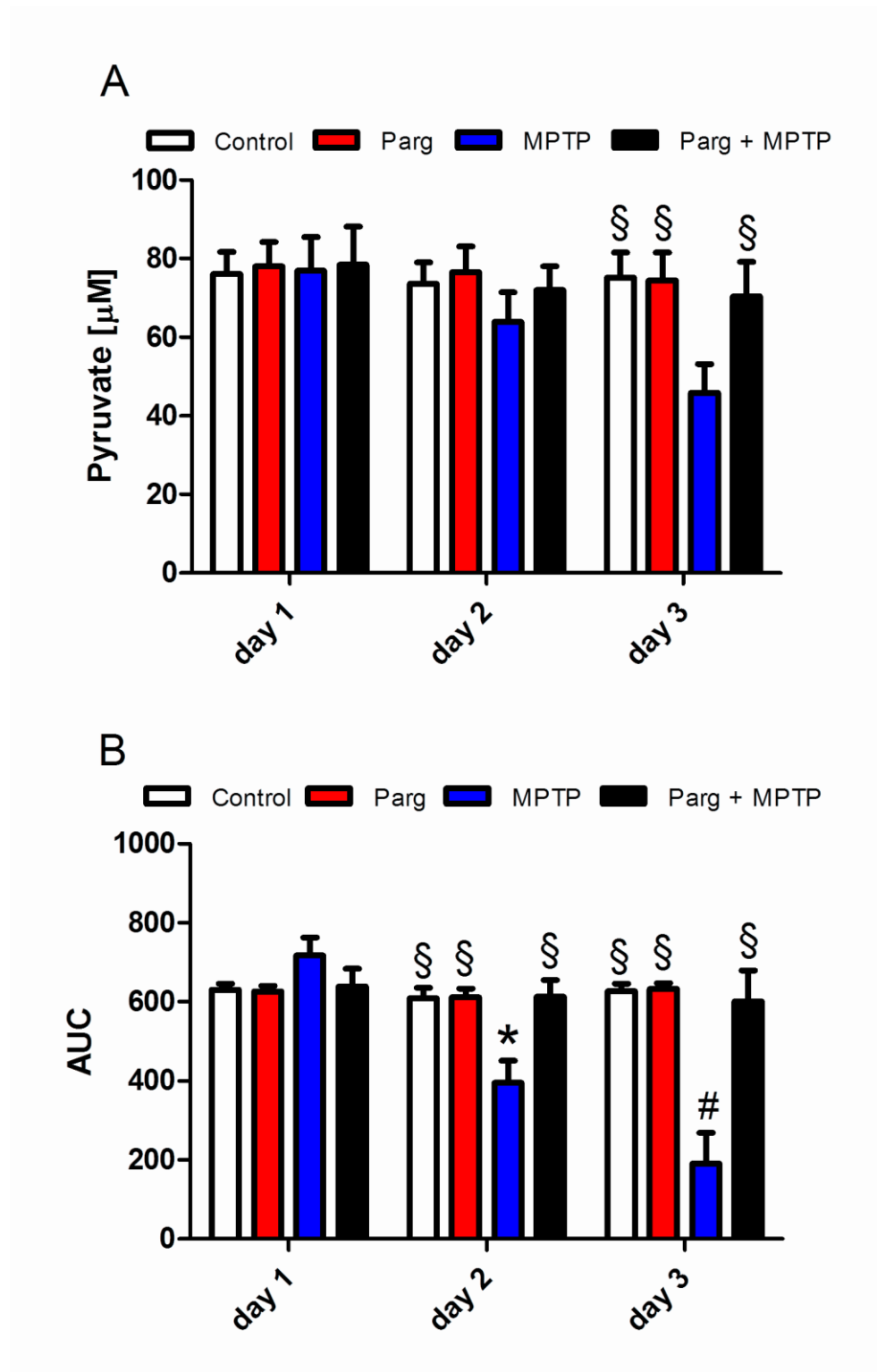


Figura 31: Variazioni dei livelli del piruvato striatale, (A) variazioni a livello basale; (B) AUC delle variazioni a seguito del trattamento con neurotossina

4.3 Effetti della somministrazione sistemica di MPTP con o senza pre-trattamento con pargilina sui rapporti L/P e L/G

Con lo scopo di individuare l'attività metabolica e un metabolismo di tipo anaerobico, sono stati studiati i rapporti L/P (Fig.32) e L/G (Fig. 33). Il rapporto L/P aumenta nell'arco dei giorni di trattamento con livelli più elevati al giorno 3 sia negli animali trattati con pargilina e senza il pre-trattamento. Senza la somministrazione della pargilina, i valori del rapporto L/P sono simili in tutti i gruppi al giorno 1 (6.931 ± 0.566). Malgrado non sia significativo, è stato osservato un incremento di 2.16 volte del rapporto L/P ai livelli basali al giorno 2 (15.860 ± 3.020) degli animali trattati con solo MPTP. Al giorno 3, il rapporto L/P aumenta di circa due volte (33.070 ± 6.855), ed è statisticamente differente dai giorni precedenti (Fig. 32 A). I ratti con il pre-trattamento con la pargilina prima della somministrazione di MPTP non hanno mostrato un aumento significativo dei valori basali del rapporto L/P, anche se inferiori a quelli indotti dal trattamento con solo MPTP (8.806 ± 1.020 al giorno 2 e 14.620 ± 1.779 al giorno 3). I valori di base del L/P per il gruppo trattato solo con la pargilina rimangono costanti durante tutto l'esperimento oscillando da 7.007 ± 0.777 a 7.547 ± 0.449 (Fig. 34 A). La somministrazione di MPTP induce un aumento dell'AUC del rapporto L/P in tutti i gruppi di animali. I valori registrati al giorno 1 e al giorno 2 sono rispettivamente 9.91 ± 0.549 e 18.46 ± 1.457 per il trattamento con MPTP e 6.359 ± 0.436 e 8.922 ± 1.335 per il gruppo con il pre-trattamento con pargilina seguito dalla somministrazione di MPTP. I valori del rapporto più elevati sono stati osservati al giorno 3, sia in animali sia hanno ricevuto il pre-trattamento (11.99 ± 1.601) che senza (63.86 ± 9.324). Non è stata osservata alcuna differenza statistica negli animali pre-trattati con la pargilina mentre, al contrario, il rapporto L/P al giorno 3 differisce statisticamente ($P < 0.05$) dai giorni precedenti negli animali trattati con la neurotossina (Fig. 32 B). Differenze statisticamente rilevanti sono state osservate per l'AUC del rapporto L/P dei ratti trattati solo con pargilina se confrontati con gruppo trattato solo con MPTP ($P < 0.05$ durante tutti i tre giorni) e con il gruppo che riceve il pre-trattamento con pargilina ($P < 0.05$ al giorno 3) (Fig. 32 B).

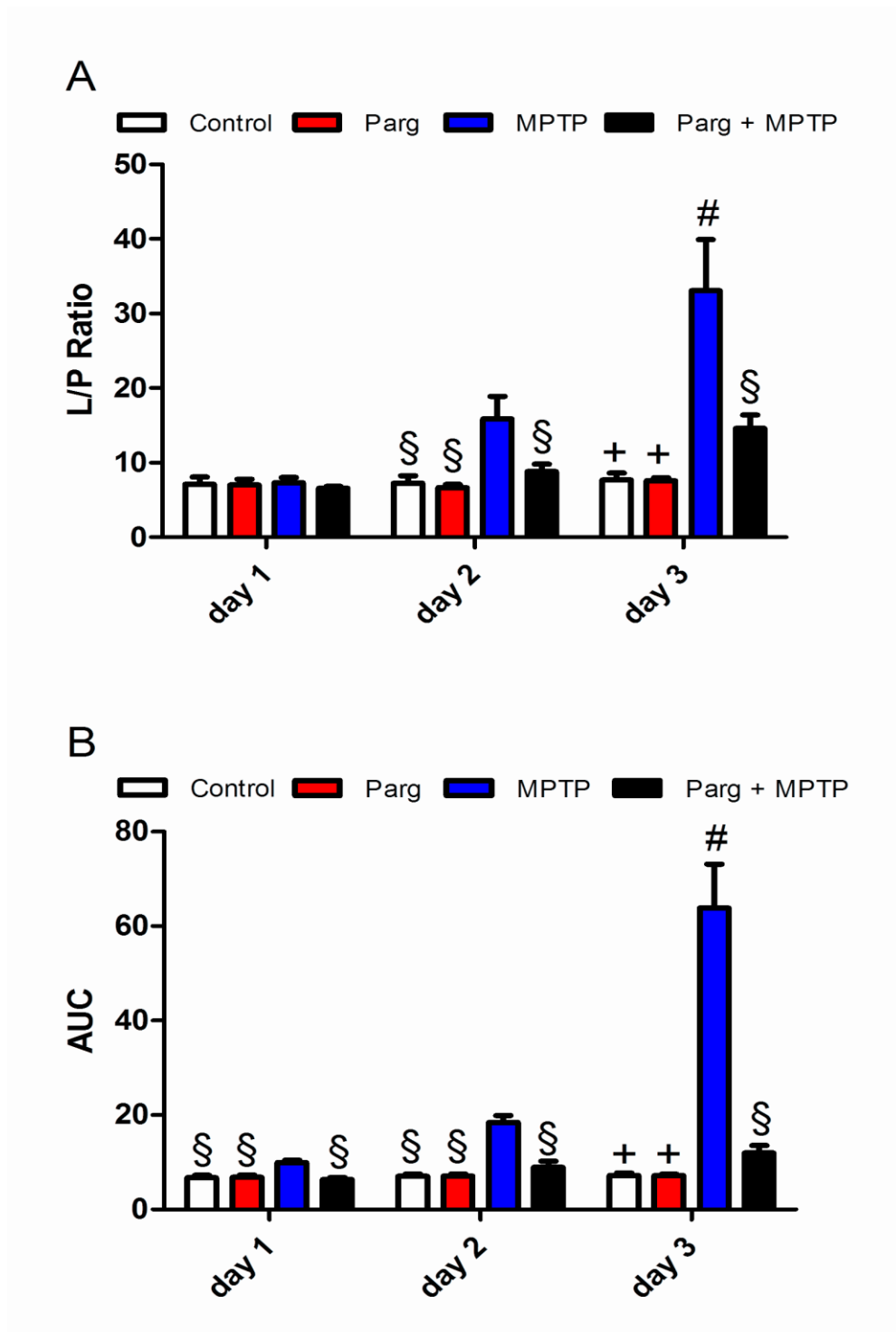


Figura 32: Variazioni dei livelli dell'indice derivato L/P, (A) variazioni a livello basale; (B) AUC delle variazioni a seguito del trattamento con neurotossina

Analogamente il rapporto lattato/glucosio (L/G) ha mostrato un incremento giornaliero, sia dei valori basali e sia dopo la somministrazione della neurotossina. I valori basali sono stati 0.651 ± 0.080 al giorno 1, 1.503 ± 0.233 al giorno 2 e 12.140 ± 2.877 al giorno 3 per il gruppo dei ratti trattati solo con l'MPTP, e 0.530 ± 0.060 al giorno 1, 0.585 ± 0.017 al giorno 2 e 4.092 ± 0.841 al giorno 3 per il gruppo di ratti pre-trattati con pargilina (Fig.33 A). Non sono state osservate modificazioni dopo la somministrazione della sola pargilina del rapporto L/G,; i valori registrati erano 0.568 ± 0.049 , 0.680 ± 0.168 e 0.657 ± 0.090 rispettivamente ai giorni, 1, 2 e 3. La somministrazione di MPTP provoca un aumento dell'AUC del rapporto L/G in tutti gli animali. I valori rilevati al giorno 1, al giorno 2 e al giorno 3 sono stati rispettivamente 0.821 ± 0.020 , 1.611 ± 0.213 e 11.010 ± 1.668 per il gruppo trattato con MPTP, e 0.635 ± 0.077 , 0.620 ± 0.005 e 1.625 ± 0.247 per il gruppo pre-trattato con pargilina seguito dalla somministrazione di MPTP (Fig. 33 B). Negli animali pre-trattati con pargilina non sono state viste differenze statisticamente importanti per tutta la durata dell'esperimento. Viceversa il rapporto L/G al giorno 3 differisce statisticamente ($P < 0.05$) dai giorni precedenti in animali trattati con l'MPTP (Fig.33 B). L'AUC per il rapporto L/G e dei ratti che hanno ricevuto solo la pargilina, così come è stato evidenziato dal rapporto L/P, differiva statisticamente se confrontato con il gruppo trattato con l'MPTP durante tutti i tre giorni, e con il gruppo che ha ricevuto il pre-trattamento con pargilina e poi la neurotossina < 0.05 al giorno 3 (Fig.33 B).

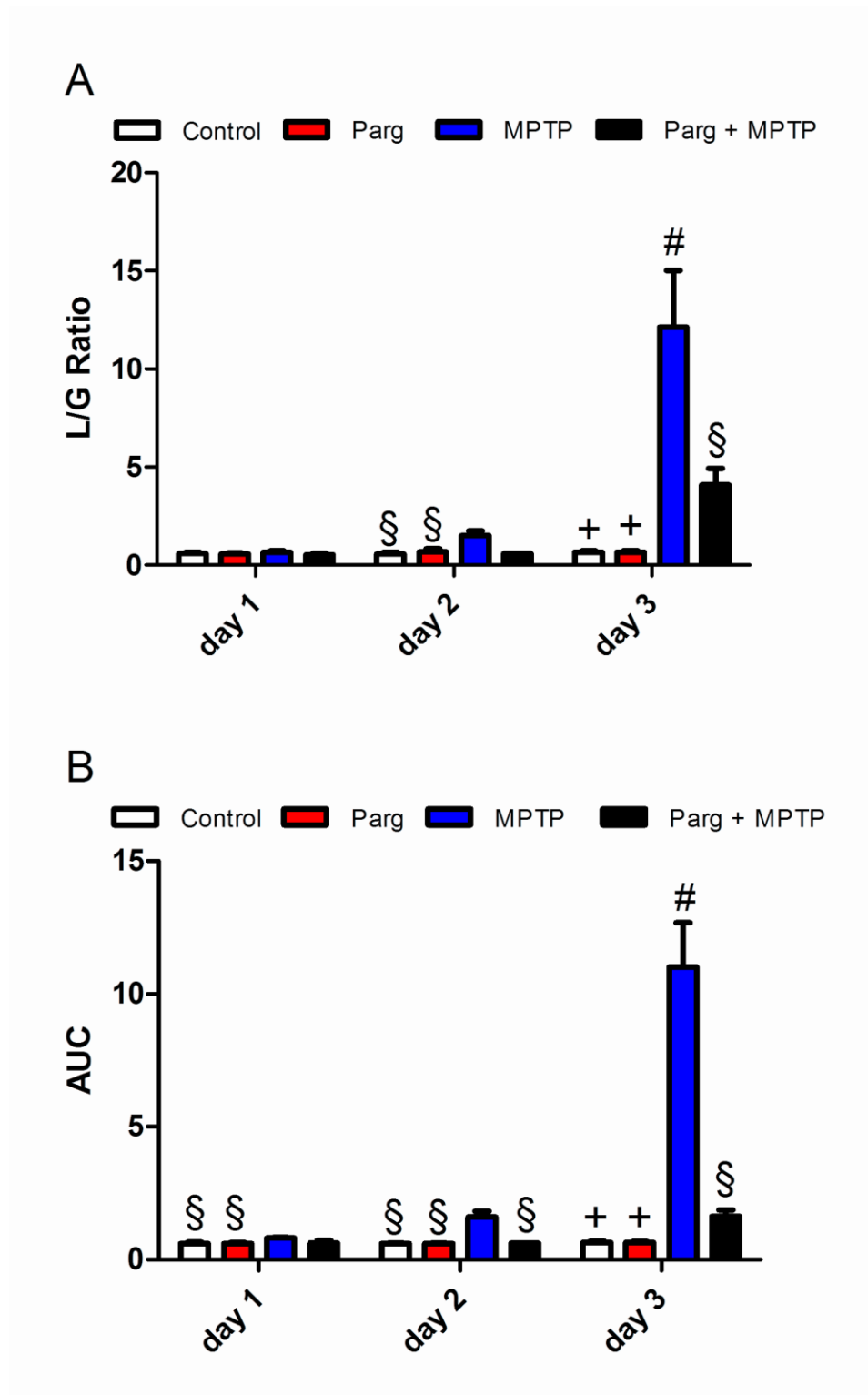


Figura 33: Variazioni dei livelli dell'indice derivato L/G, (A) variazioni a livello basale; (B) AUC delle variazioni a seguito del trattamento con neurotossina

4.4 *Analisi immunoistochimica della tirosina idrossilasi (TH)*

Come mostrato nella figura 34, sette giorni dopo l'ultima somministrazione della neurotossina, l'analisi immunoistochimica ha rivelato una diminuzione significativa della immunoreattività alla tirosina idrossilasi (TH) nella SNpc per il gruppo trattato con solo la tossina MPTP (Fig. 34 C) rispetto al gruppo di controllo (Fig. 34 A). Sebbene la SNpc del gruppo pre-trattato con pargilina e poi con l'MPTP abbia una positività inferiore rispetto al gruppo di controllo, (Fig. 34 D) ha mostrato una immunoreattività TH superiore rispetto al gruppo trattato solo con la neurotossina MPTP. Non si osserva nessuna differenza nella colorazione alla TH tra i gruppi trattati con solo con la pargilina (Fig. 34 B) e il gruppo di controllo.

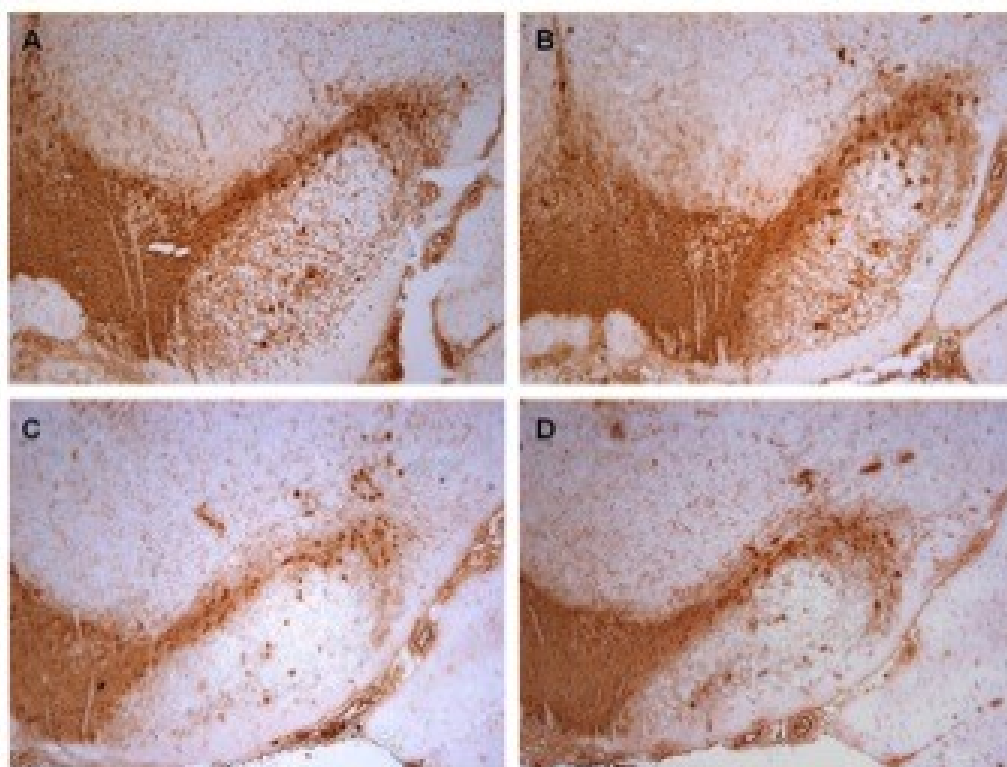


Figura 34: I preparati colorati per valutare la sensibilità alla tirosina idrossilasi (TH) per la valutazione del danno dopaminergico nella Substantia Nigra pars compacta (SNpc) 7 giorni dopo l'ultima somministrazione neurotossina MPTP.

4.5 Prove elettroniche e di calibrature del biosensore in vitro

La taratura elettronica è stata fatta al chiuso con una distanza lineare tra il dispositivo bio-telemetrico e il ricevitore al PC di circa 4 m.

Una sorgente di corrente Thevenin a due canali, è stata utilizzata per riprodurre lo studio del potenziale di interferenza del sensore con microvibrazioni sulla piccola corrente costante come risposta amperometrica di una vera cella elettrochimica, per testare il modulo amperometrico prima delle calibrazioni del biosensore (Serra et al.; 2007; Rocchitta et al.; 2007). Lo scopo di questa prova era di creare e inviare attraverso la sorgente di corrente Thevenin, una registrazione della corrente generata dai biosensori. A questo scopo è stato utilizzato un generatore di vibrazioni (Coles Electroacoustics, Hoddesdon, UK) collegato ad un segnale di rumore casuale a bassa frequenza. Come appena descritto, una corrente di 1 nA è stata riprodotta attraverso una sorgente di corrente Thevenin, ed è stata trasmessa dal dispositivo telemetrico. Il sistema è stato lasciato in queste condizioni per 4 h. È stato osservato uno spostamento massimo V_{Out} di soli 3 mV, mentre la corrente relativa al rumore elettronico era sotto 30 pA (dati non sono mostrati). Le calibrazioni dei biosensori sono state eseguite immediatamente prima dell'impianto.

Le calibrazioni in vitro per i biosensori al glucosio sono state effettuate in PBS ossigenato, mediante dodici iniezioni consecutive di una soluzione di glucosio (0.1-140 mM). I dati sono stati plottati con l'equazione di Michaelis-Menten ($R^2 = 0.987$, $n = 6$) con una I_{MAX} di 49.6 ± 3.8 nA e una K_M di 4.6 ± 0.7 mM. La risposta alle basse concentrazioni di glucosio (0-2.5 mM) ha rivelato una eccellente linearità ($R^2 = 0.998$, $n = 6$) e una regione lineare (LRS) di 7.36 ± 0.12 nA mM⁻¹.

Le calibrazioni con lattato elaborate anche queste mediante la cinetica Michaelis-Menten (Fig. 35 A); il biosensore il cui disegno conteneva la BSA e GTA ha mostrato una I_{MAX} di 59.1 ± 1.5 nA e K_M di 0.7 ± 0.1 mM ($R^2 = 0.969$, $n = 4$) e una elevata risposta LRS a basse concentrazioni di lattato (43.7 ± 1.4 nA mM⁻¹) in un range compreso tra 0 e 1 mM ($R^2 = 0.996$, $n = 6$). I biosensori per il lattato sono stati ricoperti da una membrana PU hanno mostrato una I_{MAX} e K_M di 63.6 ± 3.7 nA e

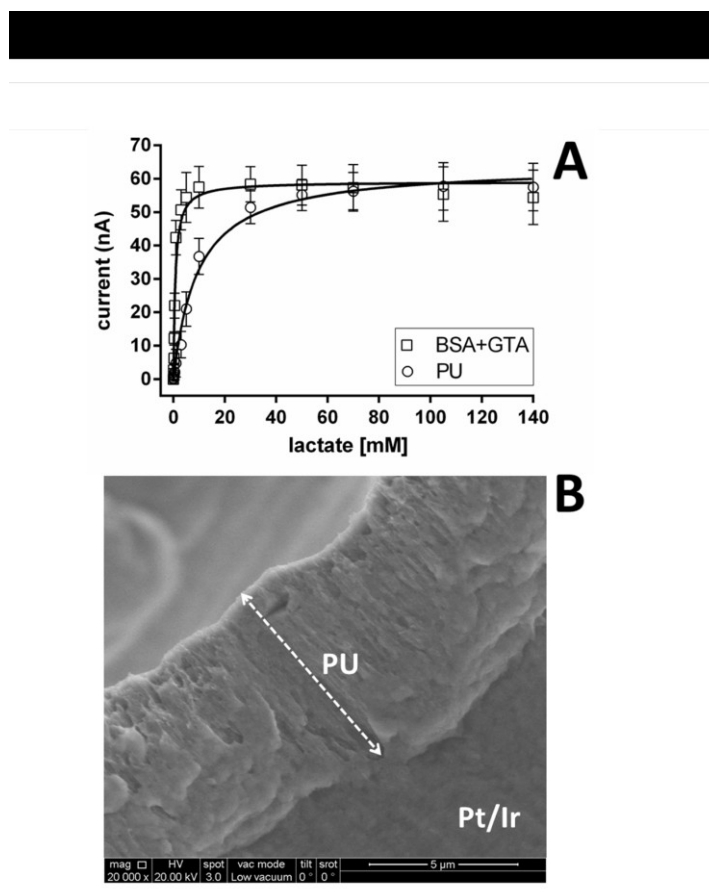


Figura 35: (A)Cinetica Michaelis-Menten dei biosensori lattato ;(B)microfotografia al SEM mediante criofrattura di un biosensore ricoperto da una membrana PU.

8.7 ± 0.9 mm rispettivamente ($R^2 = 0.964$, $n = 6$); le LRS di lattato calcolate alle basse concentrazioni (0-10 mM) hanno mostrato una buona linearità ($R^2 = 0.996$) con un valore di 4.16 ± 0.09 nA mM⁻¹.

Il film di PU consiste in una membrana spessa (≈ 7 micron di spessore) come illustrato nella figura 35 B. Le tarature con AA hanno confermato la potenza schermatura del p-OPD contro le interferenze date da specie elettroattive con una corrente di 0.97 ± 0.09 per 1 nA mM AA e una ΔI di 0.22 ± 0.06 nA ($n=12$).

4.6 Effetti di stimoli fisiologici e farmacologici sul glucosio e lattato striatale e sul movimento.

Come stimolazione fisiologica, scelta per aumentare l'attività neurale e movimento, è stato applicato un "tail pinch" per 5 min. Circa dopo 2 ore dall'inizio della registrazione, sono state registrate delle correnti di base stabili corrispondenti di 4.25 ± 0.74 nA per il biosensore del glucosio e 3.53 ± 0.67 nA per il biosensore del lattato (dati non riportati). Le correnti per il microsensore per il movimento basali, che si sono mostrate essere molto variabili, sono state registrate per 6 h prima dell'inizio degli esperimenti fisiologici e farmacologici e sono state relazionate al comportamento del ratto che vanno da 12 ± 3 mV s⁻¹ durante il sonno fino a 65 ± 9 mv s⁻¹ durante l'attività di "grooming" spontaneo (dati non mostrati). Per questo motivo gli esperimenti hanno avuto inizio dopo 30 min di registrazione in cui l'animale si muoveva poco (<35 mv s⁻¹). Il tail pinch applicato per 5 min sulla coda dei ratti (n = 3) ha comportato dei cambiamenti dei livelli di glucosio e lattato come illustrato in figura 36 e figura 37 A. Pochi secondi dopo l'applicazione dello stimolo, è stato osservato un incremento dell'attività motoria e dell'attività di grooming con un conseguente significativo aumento del movimento dell'animale (121 ± 2 mv s⁻¹ rispetto a una linea di base di 31 ± 1 mv s⁻¹, p <0.01).

Una notevole diminuzione della corrente striatale glucosio (-1.07 ± 0.3 nA; p <0.05 rispetto alla corrente basale) e un aumento della corrente di lattato (3.71 ± 0.6 nA; p <0.001 vs alla corrente basale) è stata osservata immediatamente dopo l'applicazione dello stimolo (Fig.36). Sono stati inversamente correlati i dati inerenti sia per il glucosio vs il lattato sia per il movimento vs le variazioni di glucosio (r = -0.71 e -0.72, rispettivamente, p <0.01), mentre abbiamo valutato una relazione positiva tra il movimento e le variazioni di lattato (r = 0.81, p <0.01).

La D-amfetamina è un farmaco simpatico-mimetico indiretto che induce un aumento della dopamina striatale extracellulare e del movimento degli animali. Il farmaco è stato disciolto in 2.5 ml di soluzione fisiologica e somministrati s.c. alla dose di 2 mg kg⁻¹ (n =4).

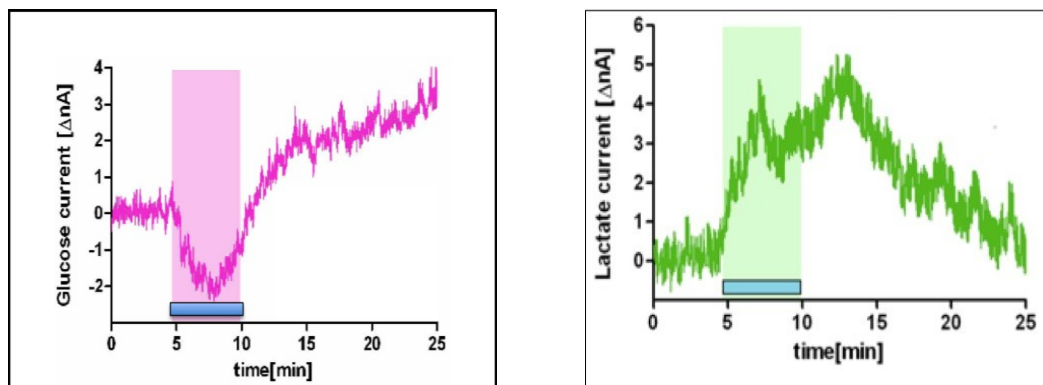


Figura 36: Risposta dei biosensori glucosio (tracciato rosa) e lattato (tracciato verde) allo stimolo fisiologico

Dopo la somministrazione d-amfetamina nei primi 5 minuti è stata registrata un incremento se pur breve della corrente striatale di lattato e una diminuzione della corrente di glucosio (Fig. 37 B). Circa dopo 8-10 minuti dalla somministrazione d-amfetamina, sono stati registrati aumenti delle correnti proporzionali all'incremento dei livelli extracellulari sia di glucosio sia di lattato sia sono rimasti elevati per più di 1 h (Fig. 37 B). La massima variazione rispetto al valore di base è stata raggiunta dopo 20-40 minuti dall'iniezione del farmaco. La valutazione è risultata statisticamente significativa ($p < 0.01$) e corrisponde a 3.5 ± 0.4 nA per il biosensore per il glucosio e 2.1 ± 0.2 nA per il biosensore per il lattato. Inoltre, è stato osservato che il movimento dell'animale aumenta ($p < 0.05$), rispetto alle condizioni di partenza (22 ± 1 mV s⁻¹), fino a 163 ± 4 mV s⁻¹ a partire da 5-10 minuti dopo la somministrazione d-amfetamina ed è rimasto alto per 35-45 min.

E' stato valutato in modo positivo il rapporto tra il movimento vs il glucosio ($r = 0.46$, $p < 0.05$) e tra il movimento vs il lattato ($r = 0.57$, $p < 0.05$), così come tra glucosio e lattato ($r = 0.82$, $p < 0.01$). Il gruppo di controllo degli animali ha ricevuto 2.5 mL di sola soluzione salina, con un conseguente aumento di breve durata della corrente di lattato striatale e una diminuzione della corrente di glucosio (dati non mostrati, ma effetti simili a quelli in Fig. 37 B).

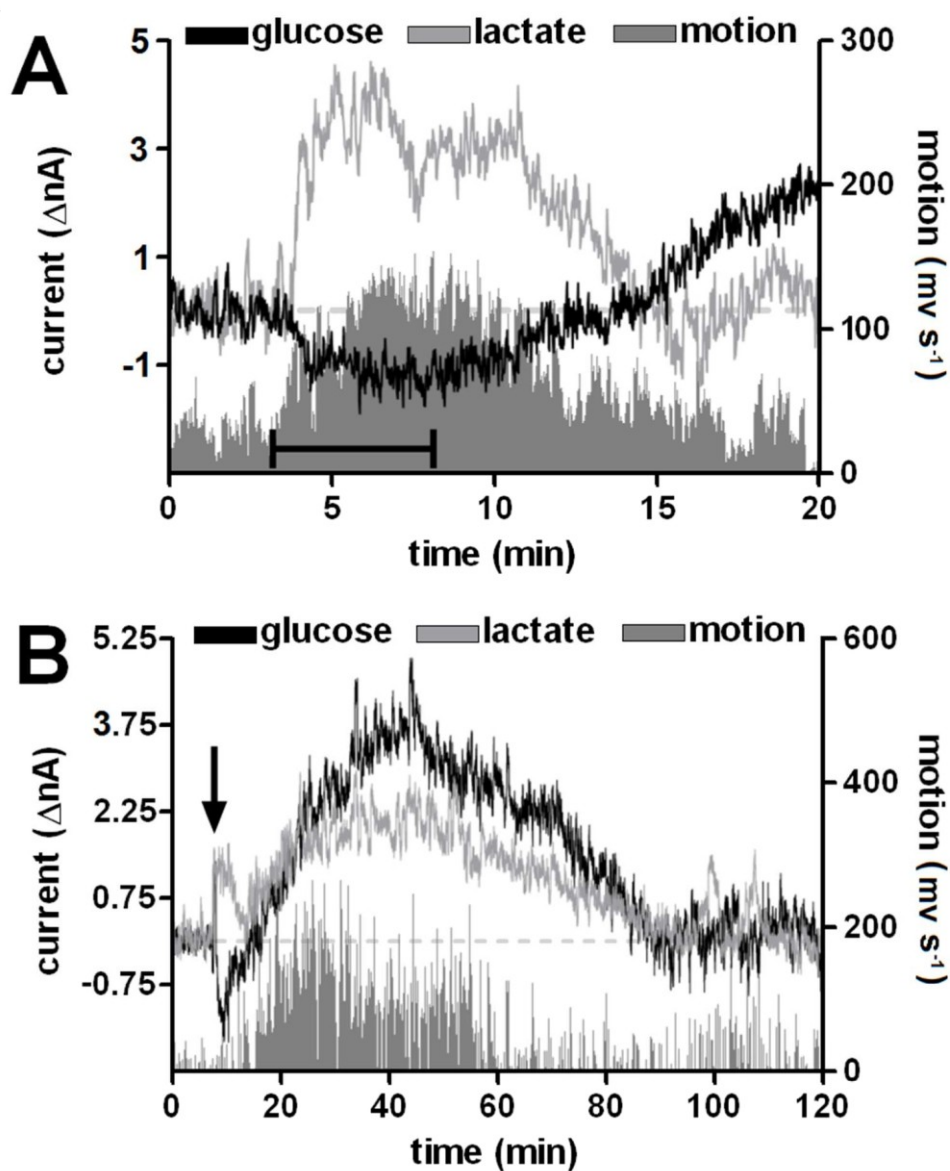


Figura 37: I grafici mostrano gli effetti fisiologici (tail pinch sulla coda, A) e farmacologici (d-anfetamina, B) sulle concentrazioni striatali extracellulari di glucosio e lattato a seguito della stimolazione in relazione al movimento degli animali.

4.7 Effetti dello stimolo fisiologico sull'ossigeno striatale

Per la lettura dell'ossigeno gli esperimenti in vivo sono stati condotti il giorno seguente all'impianto del dispositivo nello striato. Una linea di base stabile di 24.7 ± 1.3 nA (n = 6) è stata raggiunta circa 50 minuti dopo la polarizzazione dei sensori, considerando la corrente di background del microsensore in PBS/0% O₂ (-14.2 ± 0.9 nA), che corrisponde a 39.37 ± 2.26 μ M di ossigeno cerebrale, secondo quanto è stato trovato con le calibrazioni in vitro.

A questo punto all'animale è stata praticata una stimolazione fisiologica (tail pinch) della durata di 5 minuti con lo scopo di aumentare l'attività neuronale e promuovere l'aumento del flusso ematico cerebrale neuronale regionale (rCBF).

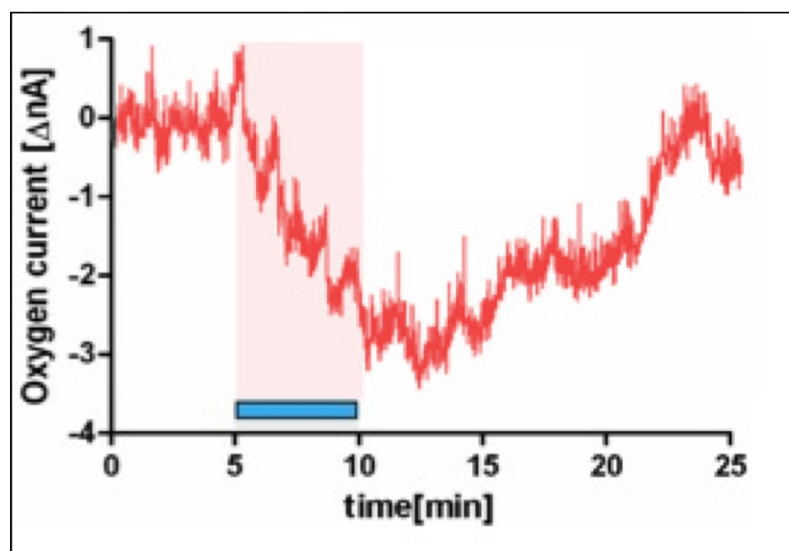


Figura 38: Effetto della stimolazione fisiologica (5 min. tail pinch, barra) sull'ossigeno cerebrale striatale

In risposta al tail pinch si è osservata una riduzione della corrente legata all'ossigeno striatale di -2.7 nA, corrispondente ad un aumento di $+ 11.69$ μ M della concentrazione dell'ossigeno rispetto ai valori basali.

4.8 Effetto dell'MPTP sul glucosio, lattato e ossigeno striatale

Tutti gli esperimenti sono stati condotti il giorno seguente l'impianto, dopo circa un ora dalla polarizzazione dei sensori, è stata raggiunta una linea di base stabile sia per il biosensore al glucosio sia quello per il lattato. Alla prima somministrazione intraperitoneale di MPTP si ha un aumento delle correnti di glucosio, lattato e ossigeno come mostrato in figura 39.

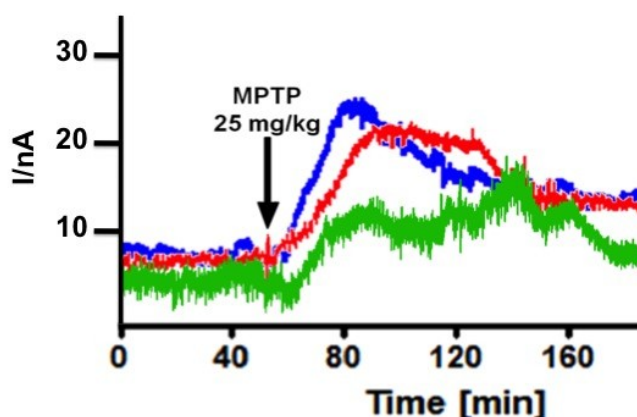


Figura 39: Risposta dei biosensori per il glucosio e lattato (tracciato verde e blu rispettivamente) e del microsensore per l'ossigeno (tracciato rosso) in risposta alla prima dose di MPTP

La corrente di glucosio aumenta, dopo la prima somministrazione di neurotossina, che tende però a ridursi nei giorni successivi anche a livello basale, al contrario il biosensore mostra dopo la somministrazione di MPTP un incremento della corrente corrispondente a un rilevante aumento, di lattato striatale. I valori basali di lattato hanno rivelato un incremento al giorno 2 e al giorno, rispetto a quello riscontrato al giorno 1.

Le ulteriori somministrazioni di MPTP nei giorni 2 e 3 non portano un incremento di lattato considerevole rispetto ai corrispondenti basali; i livelli extracellulari di lattato sono aumentati se messi a confronto solo con i livelli basali del giorno 1.

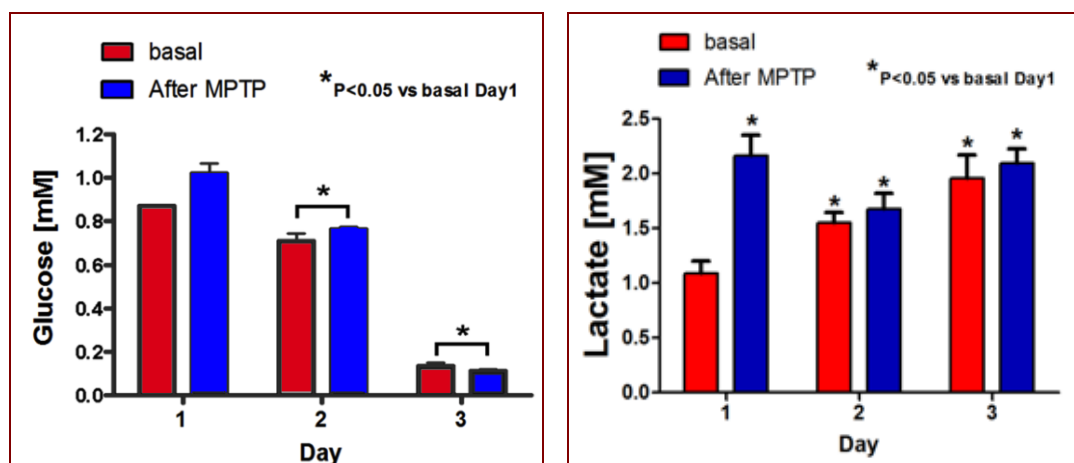


Figura 40: Effetto di un trattamento sub cronico con MPTP sul glucosio e lattato striatale

E' stata somministrata la neurotossina MPTP anche per valutare gli effetti sulle concentrazioni di ossigeno nello spazio extracellulare (Fig. 41). Con la somministrazione intraperitoneale di MPTP al giorno 1 si osserva una riduzione della corrente, corrispondente ad un aumento dei livelli di ossigeno striatale.

Ai giorni 2 e 3 è stato rilevato un progressivo e importante aumento delle concentrazioni di ossigeno sia in condizioni basali che successivo alla somministrazione di MPTP.

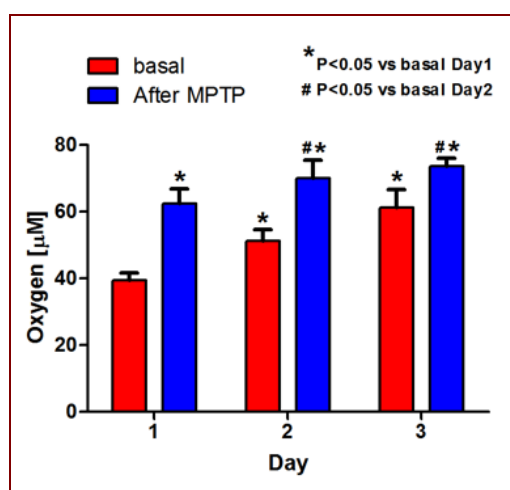


Figura 41: : Effetto dell'MPTP sulla corrente di ossigeno striatale

4.9 Biosensore per l'ATP

Le calibrazioni del biosensore per la determinazione dell'ATP sono state eseguite in PBS degasato cui è stato aggiunta una concentrazione di Mg^{2+} di 2 mM, cofattore indispensabile della HEx. Le calibrazioni si basavano su un protocollo sperimentale che prevede una prima iniezione di glucosio di 1 mM, seguita da iniezioni sequenziali di ATP (0-1 mM).

Le calibrazioni con ATP elaborate hanno mostrato una elevata risposta LRS a alle basse concentrazioni di ATP ($55.9 \pm 0.027 \text{ nA mM}^{-1}$) in un range compreso tra 0 e 0.025 mM ($R^2 = 0.986$, $n = 6$) con una sensibilità pari a 1.45 μM .

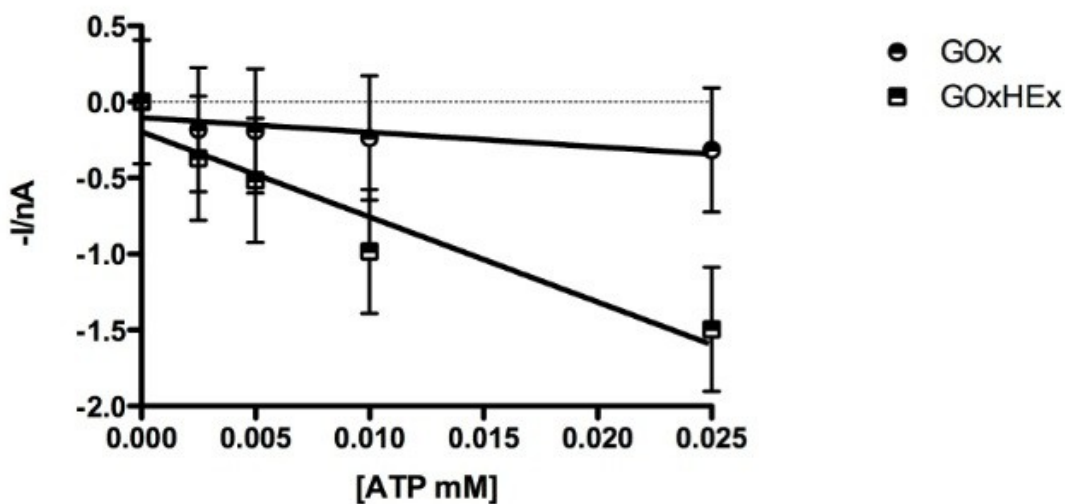


Figura 42: Calibrazione con ATP a basse concentrazioni

4.10 Biosensore per MAO B.

Le calibrazioni del biosensore MAO B sono state realizzate usando substrati specifici come DA, MPTP e 2-fenilettilammina.

Le calibrazioni per valutare l'ossigeno dipendenza del biosensore MAO-B sono state eseguite in cella a atmosfera controllata in cui era presente un microsensore per l'ossigeno. Abbiamo degasato il PBS con azoto, portando la concentrazione dell'ossigeno vicino allo zero e in un secondo tempo è stata iniettata una sola concentrazione di 2-fenilettilammina.

Successivamente è stato inserito un ossigenatore per riportare i valori di O₂ a valori atmosferici del 21% .

5 Discussione e Conclusioni

Vari studi hanno dimostrato che lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale svolgono un ruolo importante nello sviluppo di malattie neurodegenerative, come la Corea di Huntington (de Moura et al.; 2010) il morbo di Alzheimer e la malattia di Parkinson (Hastings; 2009). L'MPTP è una neurotossina ampiamente utilizzata come modello di MP sia in vivo (Serra et al.; 2002) sia in vitro (Desole et al.; 1996; Desole et al.; 1997). Negli astrociti, la monoamino-ossidasi (MAO) è l'enzima responsabile della bioattivazione dell'MPTP tramite deaminazione ossidativa in MPDP e degradazione a MPP⁺ in seguito. La neurotossina in forma attiva di MPP⁺ agisce sul complesso I mitocondriale bloccando la catena di trasporto degli elettroni, che porta ad una serie di conseguenze; come l'aumento della liberazione di radicali liberi dell'ossigeno dai mitocondri e deplezione di ATP (Miele et al.; 1995).

Recentemente, Ago e collaboratori (Ago et al.; 2011) hanno dimostrato coinvolgimento dell'enzima ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS) nella neurotossicità dopaminergica indotta da MPTP attraverso l'attivazione nitrossido-dipendente dello scambiatore Na⁺/Ca²⁺ (NCX), infatti sia l'inibizione di NCX (Ago et al.; 2011) che della nNOS (Ago et al.; 2011; Watanabe et al.; 2004), sono in grado di esercitare effetti protettivi contro la neurotossicità dell'MPTP. Anche i fattori neurotrofici come il BDNF (Takeda; 1995), GDNF (Tomic et al.; 1995) e, più recentemente, CDFN (Airavaara et al.; 2012), hanno dimostrato essere neuroprotettivi in modelli animali di Parkinson indotti da MPTP; dal danno causato dalla somministrazione di MPTP sembra che il GDNF faciliti la ricrescita delle terminazioni striatali dopaminergiche e che il CDFN protegga i corpi cellulari dei neuroni dopaminergici (Airavaara et al.; 2012). Studi precedenti hanno dimostrato che l'inibizione della monoammino ossidasi di tipo B (MAO-B), fa sì che non ci sia la conversione dell'MPTP in MPP⁺ e prevenga gli effetti tossici sui pathway dopaminergici nigrostriatali (Singh et al.; 1988). Diversi inibitori della MAO-B (IMAO-B) sono usati nel trattamento del morbo di Parkinson e nei modelli murini di MP così come altri bloccanti delle MAO-B come L-Deprenyl (Selegilina) (Wu et al.; 2005), Rasagilina (Gal et al.; 2005.) e Pargilina (Culver et al.; 2002; Murphy et al.; 1979; Serra et al.; 2008).

Nei paragrafi precedenti ho descritto i possibili effetti di un pre-trattamento con pargilina sulla neurochimica cerebrale e, per la prima volta, sui metaboliti energetici

in un modello MP indotto da MPTP usando la microdialisi cerebrale con doppio flusso asimmetrico di perfusione in gruppi di ratti liberi di muoversi (Bazzu et al.; 2011). Ho dimostrato che una singola somministrazione di MPTP aumenta il rilascio di DA e diminuisce i livelli di DOPAC nei prolungamenti dei neuroni dopaminergici. Al contrario, ripetute dosi di MPTP (secondo un protocollo modificato di trattamento sub-cronico) ha ridotto sia i livelli di DA sia di DOPAC nel dializzato striatale. Questi cambiamenti nel rilascio dei livelli extracellulari di DOPAC e DA sono in accordo con i precedenti risultati ottenuti mediante uno studio sui topi C57BL/6J (Serra et al.; 2008). Il pre-trattamento con pargilina non ha influenzato il rilascio di dopamina indotto da MPTP, mentre è stato osservato essere in grado di prevenire giorno per giorno la perdita di dopamina dopo la somministrazione della neurotossina. Questi risultati sembrano confermare un effetto diretto dell'MPTP, legato all'MPP⁺, sull'aumento extracellulare di DA, in quanto né annullata né ridotta dalla somministrazione sistemica della pargilina, come è già stato descritto in passato (Serra et al.;2008). In un gruppo separato di animali, né una sola somministrazione, né somministrazioni ripetute di sola pargilina mostrano un aumento dei livelli di DA, anzi è stata osservata una diminuzione del DOPAC che rispecchia il meccanismo d'azione della pargilina (IMAO). I dati sul metabolismo energetico dimostrano un accrescimento dei livelli di glucosio extracellulare nello striato dopo la prima somministrazione di MPTP rispetto ai valori basali. Al contrario, le somministrazioni ripetute della tossina inducono una diminuzione progressiva giorno per giorno del glucosio nel dializzato, con una concomitante riduzione anche dei suoi livelli basali. Allo stesso modo, il piruvato aumenta dopo la prima somministrazione tossina ma diminuisce drasticamente dopo la seconda e la terza dose di MPTP. Al contrario, durante l'intero periodo di trattamento, i livelli di lattato aumentano: questo è stato osservato sia a livello basale sia dopo la somministrazione di MPTP.

Dagli esperimenti in cui ho utilizzato i biosensori, sono presentati in questo studio alcuni dati preliminari, con cui ho ottenuto la variazione delle concentrazioni dei substrati energetici cerebrali durante l'attivazione neuronale dovuta a stimoli fisiologici e farmacologici. Lo studio è stato effettuato utilizzando diversi gruppi di animali, in cui sono stati impiantati nello Striato i biosensori per il glucosio e il

lattato, il microsensore per l'ossigeno e il nuovo sensore a micro vibrazione incorporato nel dispositivo bio-telemetrico. Come descritto nei materiali e metodi, in seguito alla stabilizzazione, nei ratti liberi di muoversi, sono state registrate dal biosensore correnti anodiche basali (4.25 ± 0.74 e 3.53 ± 0.67 nA rispettivamente per glucosio e lattato). Considerando che la corrente media dei biosensori in PBS saturo d'aria, registrata immediatamente prima dell'impianto, era di circa 0.3 nA, e che la risposta all'AA era ≈ 0.75 nA (i livelli basali stimati di AA nello striato sono di 0.5 mM (Miele et al.1996)), è possibile stimare la concentrazione di glucosio e lattato basale utilizzando le precalibrazioni fatte in vitro; queste risultavano corrispondere a 0.4 ± 0.1 mM di glucosio e 0.6 ± 0.15 mM di lattato, valori coerenti con i precedenti risultati ottenuti utilizzando la microdialisi in vivo (Fellows et al.1992; Bazzu et al.2011; Demestre et al. 1997).

Durante gli esperimenti di tail pinch ho osservato una significativa diminuzione della corrente di glucosio, seguito da un significativo aumento ritardato, e una concomitante accrescimento della corrente lattato e quella del sensore del movimento. Al contrario, dopo somministrazione d-amfetamina, ho rilevato un significativo aumento della corrente del biosensore per il glucosio (ma anche del lattato e del movimento), in accordo con precedenti risultati ottenuti utilizzando la microdialisi (Bazzu et al.; 2011).

Dalla somministrazione subacuta della neurotossina, ho apprezzato un incremento della corrente dei biosensori e del microsensore per l'ossigeno; questo effetto che porta all'aumento delle specie presenti nello spazio extracellulare viene mantenuto al giorno 2 e 3 solo per il lattato e l'ossigeno che aumentano anche a livello basale. Il glucosio diminuisce significativamente al giorno 2 e 3.

Attualmente, c'è una controversia ancora aperta per quanto riguarda il substrato energetico utilizzato dai neuroni e quali siano i cambiamenti metabolici durante l'attivazione neuronale (Fillenz et al.;1999; Magistretti e Pellerin;1999; Fillenz; 2005; Darbin et al.; 2006 ; Castro et al.;2009) . Fillenz e collaboratori (Fillenz et al.;1999), hanno proposto il glucosio come principale fonte di energia nei neuroni attivati: nel loro modello, il glucosio, rilasciato dal sangue, mediante il ciclo glutammato-arginina-ossido nitrico, viene convertito in glicogeno negli astrociti.

Durante l'attività neuronale, noradrenalina agisce sui recettori β -adrenergici degli astrociti, provoca la scissione del glicogeno in glucosio, che viene rilasciato nello spazio extracellulare, ripreso dai neuroni e utilizzato come substrato energetico. Al contrario, Magistretti e Pellerin (Magistretti e Pellerin;1999) hanno indicato il lattato come substrato energetico utilizzato dai neuroni attivati. Questa ipotesi, anche se controversa e non ancora pienamente accettata, è conosciuta come “Shuttle” del lattato tra gli astrociti e i neuroni (ANLSH). Secondo la teoria dell'ANLSH, durante l'attività sinaptica, il glutammato assorbito negli astrociti guida la glicolisi. Di conseguenza si ha produzione di lattato rilascio nel fluido extracellulare. Il lattato, viene ripreso dai neuroni, e convertito in piruvato e sotto questa forma utilizzato come substrato energetico nel “ciclo di Krebs”.

Recentemente , Zhu e colleghi (Zhu et al.;2012) hanno dimostrato che l'MPTP attiva i neuroni che rilasciano più dopamina e facilitano la trasmissione sinaptica, infatti hanno scoperto che l'MPTP, o i suoi derivati, induce un potenziale eccitatorio postsinaptico, che consiste in un potenziamento del rilascio da parte della vescicola presinaptica .

Questi risultati, soprattutto al giorno 1, in cui tutti i substrati energetici aumentano dopo la prima somministrazione neurotossina rispetto ai valori basali, sembrano in accordo con il modello fisiologico di entrambi Fillenz (Fillenz et al.;1999) e Magistretti (Magistretti e Pellerin;1999). E' stato precedentemente affermato che la d-amfetamina porta ad una attivazione fisiologica striatale nei roditori, con conseguente aumento dei livelli di glucosio , lattato e piruvato (Bazzu et al.;2011). L'aumento del glucosio osservato dopo la prima somministrazione di MPTP potrebbe essere spiegato con la glicogenolisi negli astrociti, in accordo con Fillenz e colleghi (Fillenz et al.;1999), invece gli astrociti esprimono la glucosio-6-fosfatasi capace di produrre glucosio endogeno (Ghosh et al. , 2005). A mio parere la scissione del glicogeno in glucosio è stata trainata dalla dopamina agendo sugli astrociti β -adrenergici e non dalla noradrenalina come descritto da Fillenz e collaboratori. In precedenti lavori il trattamento con MPTP ha mostrato di compromettere funzionamento del sistema noradrenergico (Forno et al.;1986) e di diminuire i livelli di noradrenalina nel corpo striato e del tronco cerebrale del ratto (Desole et al.;1993).

Secondo questi risultati, e come prima riportato (Bazzu et al.; 2010), i livelli di base della noradrenalina (NE) non aumentano dopo la somministrazione di MPTP e sono stati rilevati in campioni di microdialisi striatali. È stato inoltre documentato che, data la struttura simile della DA e della NE, alte concentrazioni di dopamina possono agire sui β -adrenocettori con un'efficacia simile alla NE con l'effetto inibitorio sul TNF- α e sulla produzione di nitriti (Facchinetti et al.; 2004). D'altra parte, la diminuzione registrata giorno per giorno di glucosio potrebbe essere spiegato con una ridotta produzione di glicogeno intracellulare, che è causata dalla glicogenolisi necessaria per alimentare la cellula correlata al trattamento con MPTP e alla deplezione di ATP (Miele et al.;1995).

In base a questi risultati, la diminuzione di piruvato e il concomitante aumento del lattato potrebbe esprimere l'utilizzo di una glicolisi ottimizzata per l'attività neuronale. Sebbene tali risultati si adattino bene con i modelli di Magistretti e di Fillenz, al momento non sono in grado di spiegare in modo chiaro se il glucosio sia utilizzato come substrato energetico dagli astrociti, con conseguente rilascio di lattato nella fessura sinaptica, in accordo con Magistretti e colleghi, o se è sia direttamente metabolizzato in lattato dai neuroni attivati. Inoltre, è stato provato che l'MPTP induce l'apoptosi nei neuroni dopaminergici (Serra et al.; 2002) e ha effetto sul metabolismo energetico. E' stata svelata una compromissione mitocondriale del compartimento striatale, dovuta alla somministrazione della neurotossina come suggerito dall'aumento dei rapporti L/P e L/G. Infatti, i rapporti L/P e L/G che aumentano nel cervello sono indicativi dell'impiego di un metabolismo anaerobico (Darbin et al.; 2006) come la produzione di lattato supportata durante le lesioni apportate dagli attacchi ischemici (Thomale et al.;2007; Kelly et al.;2000; Bergsneider et al.;1997; Goodman et al.; 1999). Un altro aspetto da tenere in considerazione è che le modifiche dei metaboliti energetici extracellulari potrebbe riflettere variazioni sistemiche o, più probabilmente, cambiamenti nella permeabilità della BEE. Infatti, è noto che lo stress ossidativo e la neuro infiammazione possano avere effetti deleteri sull'integrità della BEE e con perdita in parte della capacità di essere selettiva, come osservato in animali trattati con MPTP (Zhao et al.; 2007; Chen et al.;2008) e in pazienti con MP (Kortekaas et al.; 2005).

Il glucosio e il lattato presente e distribuito dal sangue potrebbe anche contribuire direttamente alla fornitura del compartimento extracellulare (Barros et al.; 2007; Gordon et al.; 2008; Moreno et al.; 2013). Il pretrattamento con la pargilina ha impedito l'esaurimento del glucosio e del piruvato e l'accumulo di lattato al giorno 1 e al giorno 2, con una conseguente diminuzione dei rapporti L/P e L/G rispetto ai ratti trattati con solo con l'MPTP. D'altra parte, la pargilina non era in grado di neutralizzare completamente gli effetti MPTP al giorno 3. La somma degli effetti nocivi per l'accumulo di composti neurotossici è ritenuto responsabile dell'insorgenza di MP (Zhu et al.; 2012). Per questo motivo, i valori più elevati dei rapporti degli indici derivati L/P e L/G sono stati osservati al giorno 3, suggerendo l'instaurarsi di un danno rispetto al gruppo di controllo. Tuttavia, tali rapporti erano più bassi se confrontati con i valori corrispondenti ai ratti trattati con solo l'MPTP, e questo indica un'attività neuroprotettiva anche se parziale svolta dalla pargilina. Per confermare ulteriormente un ruolo neuroprotettivo della pargilina, tutti gli animali sono stati sacrificati 7 giorni dopo l'ultima somministrazione neurotossina e il cervello è stato processato con l'immunoistochimica per la tirosina idrossilasi (TH). La più grave diminuzione della colorazione alla TH è stata trovata nella SNpc dei ratti che hanno ricevuto solo la somministrazione di MPTP, con una conseguente perdita più alta di neuroni dopaminergici. Il pre-trattamento con la pargilina di conseguenza mostra un'aumentata positività alla TH rispetto agli animali che hanno ricevuto solo l'MPTP, anche se la positività è inferiore agli animali di controllo. Come atteso, l'immunoistochimica per la TH di ratti trattati con solo la pargilina non differiva dagli animali di controllo.

Sebbene diversi autori somministrino dosi di pargilina di 70 mg/kg (Bueno-Nava et al.; 2012; Okada et al.; 2011), nel presente studio fatto con i ratti, e come in una precedente ricerca sui topi (Serra et al.; 2008), è stato documentato che dosi di 15 mg/kg di pargilina sono sufficienti a prevenire giorno per giorno la perdita di dopamina dopo somministrazione neurotossina. Inoltre, Pai e Ravindranath hanno dimostrato che una dose di 15mg/kg i.p. di pargilina inibisce l'attività mitocondriale delle MAO di circa il 60% (Pai et Ravindranath; 1991). Questi dati sono stati confermati anche dagli esperimenti condotti utilizzando i biosensori, ma il dato

molto interessante è stato quello ottenuto con il microsensore per determinare l'ossigeno, che ha dato prova che, sebbene siamo davanti ad un metabolismo anaerobico l'ambiente è ricco di ossigeno, per cui siamo davanti a una glicolisi aerobica. L'ossigeno presente potrebbe alimentare l'attivazione della neurotossina o la distruzione della dopamina da parte delle MAO-B o per fenomeni di autossidazione e pertanto non è utilizzato per svolgere le normali funzioni fisiologiche della cellula per la presenza di danno a livello mitocondriale.

Secondo questi risultati, gli effetti del metabolismo energetico di cui sopra e riassunte in particolare dai rapporti L/P e L/G, sorreggono una parziale attività neuroprotettiva della pargilina nel modello della malattia di Parkinson indotta da MPTP. Nel complesso, questi risultati sperimentali suggeriscono che lo studio dei cambiamenti di metaboliti energetici, insieme con la dinamica della dopamina, potrebbe essere uno strumento utile come indicatore indiretto di danno mitocondriale e protezione in modelli animali di MP.

Ottimizzazione sistema telemetrico

Il circuito analogico del dispositivo bio-telemetrico è stato ottimizzato per singola trasmissione, con funzionamento a bassa tensione, utilizzando un singolo stadio di amplificazione e riduzione del numero di componenti elettronici. Il modulo amperometrico è costruito intorno a una determinata tensione (1.22 V, Vz) generata da un diodo Zener a bassissima potenza. Il WE è stato stabilizzato a 700 mV mediante un partitore di tensione tamponato. L'imput del modulo è stato fissato a 50 MW, R1 e R2, amplificatori operazionali dei convertitori corrente-tensione gestite con un fattore di amplificazione di 20 nA/V. In questo come ho descritto nei paragrafi precedenti sono state superate con successo le limitazioni del disegno precedente, (Calia et al.; 2009, Serra et al.;2007, Rocchita et al.;2007) connesse alle variazioni dei valori della resistenza, principalmente nel circuito differenza.

In realtà è stato completamente soppressa la differenziazione di trasferimento al firmware del Vapp in sottrazione come precedentemente implementato dall'hardware (Serra et al.;2007, Rocchita et al.;2007). L'ingresso ADC del microcontrollore era direttamente collegato a Vout1, Vout2 e VApp.

Il vantaggio principale dell'elettronica descritta è che V_z e V_{App} sono indipendenti dalla caduta di tensione relativa a scarica della batteria. Il risultato è che il modulo è caratterizzato da guadagno precisione, stabilità, e una ottima risposta lineare.

Il sistema può funzionare solo in modalità ossidazione, ed è particolarmente adatto a lavorare con sensori con ossidazione diretta, come AA o microsensori dopamina, (Ilinoiu et al.; 2013) o biosensori che producono H_2O_2 con enzimi della famiglia delle ossidasi come in questo studio. L'aggiunta del sensore micro-vibrazione all'unità digitale originale è stata eseguita senza profonde modifiche hardware. In effetti, il MVS è stato direttamente saldato sulla superficie della tavola Z430-RF2500 dopo la rimozione del pulsante originale spinta (Fig. 2, pannello A).

Nonostante tutto il tipo di informazioni ottenute dal MVS sono meno distinte rispetto ad altri dispositivi (ad esempio, accelerometri a tre assi), e i risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano con successo il suo uso per il monitoraggio del movimento animale, espresso come somma di micro-vibrazioni al secondo. Non era necessario un circuito extra-driving complesso, che insieme al basso peso e al costo del dispositivo, rende ideale il MVS per l'integrazione nell'unità bio-telemetrica. Il consumo di energia dell'intera unità, inferiore a $500 \mu W$, garantisce una lunga durata della batteria (più di una settimana di funzionamento continuo con una 240 mAh CR2032 Li/MnO₂ batteria a moneta). Il sistema bio-telemetrico stato interfacciato al software tramite USB con la possibilità di accesso ad alto livello per i pacchetti ricevuti. Ciò significa che l'ulteriore manipolazione dei dati potrebbe essere fatto per mezzo di pacchetti software ampiamente utilizzati come LabView[®] o DASyLab[®]. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti al chiuso, in un intervallo tra 0 e 5 metri, senza problemi di comunicazione. Il peso dell'unità bio-telemetria montabile è compatibile con i dispositivi commerciali simili, essa rappresenta ~3% del peso corporeo ratto (Morita et al.;2007), ed è stato ben tollerato dagli animali in accordo con altri studi (Leon et al.;2004). Uno degli obiettivi più importanti dello sviluppo e caratterizzazione dei biosensori è di assicurare che operino nella regione risposta lineare durante le fluttuazioni dei corrispondenti substrati nel mezzo in cui vanno impiantati. Utilizzando la microdialisi a basso flusso, (Bazzu et al.; 2011) è stato

osservato che i livelli basali di glucosio e di lattato in ECF striatali sono circa 0,4 e 0,7 mM rispettivamente.

Mentre l'immobilizzazione di GOx usando BSA/GTA ha mantenuto la costante di Michaelis KM di circa 5 mM (sufficiente per il monitoraggio del glucosio striatale nella regione lineare), l'immobilizzazione di LOx utilizzando la stessa procedura comportato un evidente Km 0.74 mM, troppo bassa per seguire i cambiamenti delle concentrazione di lattato striatali ed evitare la saturazione biosensore. Per questo motivo, è stato depositata una membrana polimerica aggiuntiva, di poliuretano, sulla superficie degli strati LOx / PEI (invece di BSA/GTA) al fine di ridurre la diffusione del substrato e per aumentare la gamma dinamica (Schuvailo et al. 2006) dei biosensori al lattato aumentando loro KM. I valori IMAX erano vicini ai due disegni biosensore lattato suggerendo che il caricamento LOx (il numero di molecole di enzima attivo) è quasi la stessa in entrambi i modelli. Sorprendentemente, anche lo spesso strato di poliuretano da 7 micron non ha ampliato la straordinaria capacità di blocco per l'AA (> 99,8%) dello strato p-OPD.

Biosensore per l'ATP

L'ATP, è una molecola fondamentale per la sopravvivenza, implicata in numerosi meccanismi intracellulari e la sua deplezione comporta danni talvolta irreversibili. Per tanto la causa o la concausa di numerose patologie sono danneggiamenti a carico del mitocondrio che provocano riduzione di ATP intracellulare. A livello del SNC la concentrazione citoplasmatica di ATP è compresa tra 5-10 mM che nelle vescicole arriva anche 100 mM; concentrazioni che tendono a ridursi nel compartimento extracellulare intorno 5-20 μ M. La determinazione della quantità di ATP è stata sempre affidata a metodi indiretti, l'impiego dei biosensori è un sistema innovativo e immediato. Il nostro biosensore, sebbene sia molto sensibile, rispetto ai modelli riportati in letteratura (Soldatkin et al.;2009), non si è mostrato utile a un possibile impiego in modelli animali perché poco sensibile a quelle che sono le concentrazioni extracellulari di ATP. Questo sistema potrebbe pertanto essere impiegato in studi che usano modelli cellulari per valutare la quantità di ATP presente.

Biosensore MAO B

I biosensori basati sulle MAO B potrebbero rappresentare degli ottimi strumenti per la realizzazione di nuove strategie terapeutiche contro la MP. Infatti l'attività enzimatica potrebbe essere modulata dalla somministrazione di farmaci che la riducono o lo inibiscono. Questa procedura aumenterebbe la risoluzione temporale dell'acquisizione dei risultati permettendo di valutare in tempo reale gli effetti prodotti dal farmaco sull'enzima. Come tutte le ossidasi, l'attività delle MAO B è modulata dalla variazione della concentrazione dell'ossigeno. Ho presentato dei dati preliminari in cui è stata valutata l'ossigeno dipendenza dell'enzima, in risposta la somministrazione del substrato 2-feniletilammina. Diversi esperimenti preliminari dimostrano che questa molecola non presenta proprietà elettroattive (dati non mostrati) e non viene ossidata sulla superficie del trasduttore di platino al potenziale applicato di +700 mV vs Ag/AgCl. Le MAO B, in assenza di O₂ che funge da accettore di elettroni durante la reazione di ossido-riduzione, non possono catalizzare la conversione della 2-feniletilammina, nel suo corrispondente prodotto aldeidico e H₂O₂. La calibrazione con ossigeno in presenza di una concentrazione costante di 2-feniletilammina ha mostrato che l'enzima è sensibile alle variazioni delle concentrazioni di ossigeno. Nello striato la concentrazione di ossigeno è stimata intorno a 35 μM (Bazzu et al.2009), dai nostri risultati abbiamo ottenuto che la KM per l'ossigeno del biosensore corrisponde a una concentrazione di circa 70 μM, per tanto il nostro biosensore non può come tale essere impiegato per studi *in vivo*, poiché le variazioni delle fluttuazioni di ossigeno nel cervello non sono costanti. Il nostro, biosensore, pur non essendo utile *in vivo* potrebbe essere usato *in vitro*, in cui le concentrazioni di ossigeno rimangono costanti. Il fatto che le MAO B siano ossigeno dipendenti, e che come ho dimostrato nei paragrafi precedenti che l'ossigeno aumenta dopo trattamento con MPTP, avvalora *in vitro*, che l'aumento dell'ossigeno accresce la conversione di MPTP in MPP⁺ e di conseguenza il danno a livello cellulare. Per tanto si potrebbe impiegarlo per testare l'attività dell'enzima in risposta a trattamenti farmacologici che ne inibiscono l'attività come la pargilina e la selegilina. In questo modo sarebbe possibile ottenere una curva dose-risposta

immediata ed essere adottato nella validazione di nuovi trattamenti per la cura della MP .

Conclusioni

Per concludere, in questo lavoro ho studiato la dinamica della trasmissione dopaminergica e misurato le variazioni di glucosio, lattato, piruvato, i rapporti L/P e L/G in un regime di trattamento sub-acuto di MPTP con o senza pre-trattamento con pargilina. Ho potuto osservare una diminuzione dei livelli di dopamina striatale e uno spostamento verso il metabolismo anaerobico dopo la somministrazione di MPTP. I risultati complessivi di questo studio dimostrano la disfunzione mitocondriale che non permette l'ossidazione del piruvato, con una deplezione di glucosio e un aumento dei livelli extracellulari lattato, determina il blocco energetico neuronale. Il pretrattamento con la pargilina mostra una protezione parziale sia sulla dopamina striatale sia sul metabolismo energetico, riducendo gli effetti tossici di MPTP e la conservazione, almeno in parte, dell'omeostasi energetica striatale. I cambiamenti dei substrati e dei prodotti energetici, insieme alla dinamica della dopamina, potrebbero dimostrarsi uno strumento utile come indicatori indiretti del danno mitocondriale e della protezione nei modelli di MP, come conseguenza della somministrazione di MPTP come tale o 6-OHDA. Inoltre ho descritto un nuovo sistema di telemetria per il monitoraggio simultaneo in tempo reale dei parametri glucosio, lattato e ossigeno nel cervello e del biosensore del movimento. Sebbene costruiti con componenti semplici e poco costose, il dispositivo di bio-telemetria è stato utilizzato per un accurata trasduzione delle correnti anodiche di ossidazione e catodiche di riduzione generate rispettivamente sulla superficie dei biosensori impiantati di glucosio, di lattato e di ossigeno, così come le micro-vibrazioni create dall'animale. La registrazione simultanea della neurochimica cerebrale e del movimento potrebbe avere un impatto importante nello studio dei disturbi del movimento legati al morbo di Parkinson, utilizzando animali liberi di muoversi se trattati con neurotossine come MPTP, 6-OHDA e/o Rotenone in associazione a pretrattamento con pargilina o altri farmaci impiegati nella terapia del Parkinson. I progetti sono in atto per integrare un accelerometro a tre assi, un dispositivo amperometrico per la detection di ATP potrebbe fornire uno strumento utile agli studi di bioenergetica in vivo e in vitro inoltre, il biosensore con le MAO B potrebbe portare allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici e nuovi farmaci

6 *Riassunto*

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa cronica e progressiva, causata dalla perdita della via nigro-striatale e dovuta all'alterazione dei processi di degradazione delle proteine nei neuroni dopaminergici della SNpc. In questo studio, sono stati condotti esperimenti su ratti Wistar sottoposti a trattamento sub-acuto con MPTP, e a un pretrattamento con pargilina. È stata confermata una marcata riduzione della dopamina tissutale striatale, l'incremento del turnover della DA e della formazione di ROS, e del conseguente instaurarsi di una condizione di stress ossidativo. Gli esperimenti microdialitici sui ratti sottoposti ad un trattamento sub-acuto, hanno dimostrato che l'MPTP è in grado di indurre un massivo release di DA nello striato, e che questo release risulta parzialmente attenuato dalla somministrazione della pargilina. Si è inoltre dimostrata una diretta proporzionalità tra la somministrazione della tossina e l'impairment motorio, e la sua dose-dipendenza. L'MPTP ha, inoltre, dimostrato effetti anche sul metabolismo energetico striatale, alterando in particolare i livelli di glucosio lattato e piruvato e i rapporti degli indici derivati L/P e L/G, determinando quindi, nello striato, il passaggio da un metabolismo aerobio ad uno anaerobio ma soprattutto un irreversibile danno mitocondriale. Questi effetti sono parzialmente revertiti dalla pargilina che contrasta in parte gli effetti della neurotossina svolgendo la sua azione neuroprotettiva sui metaboliti energetici. Gli esperimenti condotti utilizzando i biosensori, hanno messo in luce quelle che sono le variazioni nei livelli di glucosio, lattato, ossigeno e movimento in risposta ad uno stimolo fisiologico e farmacologico. In più siamo andati a valutare gli stessi livelli in risposta a trattamento con MPTP. Abbiamo visto che i biosensori confermano i dati che abbiamo ottenuto con la microdialisi in cui si ha la riduzione dei livelli di glucosio e un incremento dei livelli di lattato. In più abbiamo visto che l'ossigeno aumenta in risposta al trattamento con la neurotossina. L'ossigeno presente potrebbe alimentare l'attivazione della neurotossina o la distruzione della dopamina da parte delle MAO B o per fenomeni di autossidazione e pertanto è utilizzato non per svolgere le normali funzioni fisiologiche perché alla base abbiamo un danno a livello mitocondriale. Il modello di malattia di Parkinson con MPTP studiato in dettaglio con registrazione simultanea della neurochimica cerebrale e del movimento potrebbe avere un impatto importante nello studio dei disturbi del movimento legati al morbo di Parkinson, utilizzando animali liberi di

muoversi se trattati con neurotossine come MPTP, 6-OHDA e/o Rotenone in associazione a pretrattamento con pargilina o altri farmaci impiegati nella terapia del Parkinson. I progetti sono in atto per integrare un accelerometro a tre assi, un dispositivo amperometrico per la detection di ATP potrebbe fornire uno strumento utile agli studi di bioenergetica in vivo e in vitro inoltre, il biosensore con le MAOB potrebbe portare allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici e nuovi farmaci

7 *Bibliografia*

- Aguggini G.**, Beghelli V., Giulio LF. Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. 1992.UTET.
- Ago, Y.**, Kawasaki, T., Nashida, T., Ota, Y., Cong, Y., Kitamoto, M., Takahashi, T., Takuma, K., Matsuda, T., (2011). SEA0400, a specific Na^+ / Ca^{2+} exchange inhibitor, prevents dopaminergic neurotoxicity in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 61, 1441–1451.
- Airavaara, M.**, Harvey, B.K., Voutilainen, M.H., Shen, H., Chou, J., Lindholm, P., Lindahl, M., Tuominen, R.K., Saarna, M., Hoffer, B., Wang, Y., (2012). CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. *Cell Transplant* 21, 1213–1223.
- Alberts B.**, Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2009) *BIOLOGIA MOLECOLARE DELLA CELLULA*
- Arenas E.** Towards stem cell replacement therapies for Parkinson's disease.(2010) *Biochem Biophys Res Commun*, 396: 152–156.
- Arif I.A.**, Khan H.A. Environmental toxins and Parkinson's disease: Putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress. (2011) *Toxicology and Industrial Health*. 26(2):121-128.
- Aubert A.**, Costalat R., Magistretti P.J., Pellerin L. (2005). Brain lactate kinetics: modelling evidence for neuronal lactate uptake upon activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 16448-16453.
- Bazzu G.**, Puggioni G.G., Dedola S., Calia G., Rocchitta G., Migheli R., Desole M.S., Lowry J.P., O'Neill R.D., Serra P.A. (2009). Real-time monitoring of brain tissue oxygen using a miniaturized biotelemetric device implanted in freely-moving rats. *Anal. Chem.*, 81, 2235–2241.
- Bazzu G.**, Rocchitta G., Migheli R., Alvau M. D., Zinellu M., Puggioni G., Calia G., Mercanti G., Giusti P., Desole M.S., Serra P.A. (2013). Effects of the neurotoxin MPTP and pargyline protection on extracellular energy metabolites and dopamine levels in the striatum of freely-moving rats, *Brain Reserch*.
- Bazzu, G.**, Biosa, A.; Farina, D., Spissu, Y.; Dedola, S.; Calia, G.; Puggioni, G.; Rocchitta, G.; Migheli, R.; Desole, M. S.; Serra, P. A. (2011) *Talanta.*, 85 (4) 1933-1940.
- Benedetto A.**, Au C., Aschner M. Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. (2009). *Chem Rev*. 109(10):4862-84.

- Benveniste H.**, Introduction to intracerebral microdialysis. In: T.E. Robinson and J.B. Justice. *Microdialysis in the Neurosciences*, (1991). *Elsevier Science Publishers B.V.*
- Berman B.S.**, Hastings T.G. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. (1999). *J Neurochem.* 73(3):1127-37.
- Betarbet R.**, Sherer T.B., Mackenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V., Greenamyre J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. (2000). *Nature Neuroscience*, 3(12), 1301-1306.
- Blum D.**, Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A.L., Sadoul R., Verna J.M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. (2001). *Progress in neurobiology*, 65(2), 135-172.
- Bueno-Nava A.**, Gonzalez-Pina R., Alfaro-Rodriguez A., Avila-Luna A., Arch-Tirado E., Alonso-Spilsbury M., (2012). The selective inhibition of the D1 dopamine receptor results in an increase of metabolized dopamine in the rat striatum. *Neurochem Res.* 37(8):1783-1789.
- Calia G.**, Rocchitta G., Migheli R., Puggioni G.G., Spissu Y., Bazzu G., Mazzarello V., Lowry J.P., O'Neill R.D., Desole M.S. & Serra, P.A. (2009). Biotelemetric Monitoring of Brain Neurochemistry in Conscious Rats Using Microsensors and Biosensors. *Sensors*, 9, 2511- 2523.
- Coskun P.**, Wyrembak J, Schriener SE, Chen HW, Marciniack C, LaFerla F, Wallace DC. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. (2011). *Biochimica et Biophysica Acta*. doi:10.1016/j.bbagen.2011.08.008.
- Culver K.E.**, Rosenfeld J.M., Szechtman H., (2002). Monoamine oxidase inhibitor-induced blockade of locomotor sensitization to quinpirole: role of striatal dopamine uptake inhibition. *Neuropharmacology*.43, 385-393.
- Day B.J.**, Patel M., Calavetta L., Chang L.Y., Stamler J.S. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(22):12760-12765.
- de Moura M.B.**, dos Santos L.S., Van Houten B., (2010). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. *Environ Mol Mutagen.* 51, 391-405
- Demestre, M.**; Boutelle, M.; Fillenz, M. (1997) *J. Physiol. (Lond.)*, 499 (Pt 3), 825-832.

Desole M.S., Esposito G., Migheli R., Sircana S., Delogu M.R., Fresu L., Miele M., de Natale G., Miele E. Glutathione deficiency potentiates manganese toxicity in rat striatum and brainstem and in PC12 cells. (1996)*Pharmacol Res.* 36(4):285-92.

Desole M.S., Sciola L., Delogu M.R., Sircana S., Migheli R., (1996). Manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine induce apoptosis in PC12 cells. *Neurosci Lett.* 209(3), 193-196.

Desole M.S., Sciola L., Delogu M.R., Sircana S., Migheli R., Miele E., (1997). Role of oxidative stress in the manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurochem Int.* 31(2), 169-176.

Desole M.S., Sciola L., Delogu M.R., Sircana S., Migheli R., Miele E. Role of oxidative stress in the manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells. (1997).*Neurochem Int.* 31(2):169-76.

Dodson M.W. and Guo M. Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. (2007). *Current Opinion in Neurobiology.* 17:331-337.

Dodson M.W. and Guo M. Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. (2007).*Current Opinion in Neurobiology.* 17:331-337.

Drechsel D.R., Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. (2008). *Free Radic Biol Med.*, 44(11):1873-86.

Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. (2000) *Prog Neurobiol.*;62(6):649-71.

Emborg EM. Nonhuman Primate Models of Parkinson's Disease, (2007), Vol.48, Number 4.

Fellows, L. K.; Boutelle, M. G.; Fillenz, M. (1992) *J. Neurochem.*, 59, 2141–2147.

Fillenz M., Lowry J.P., Boutelle M.G., Fray A.E., (1999) The role of astrocytes and noradrenaline in neuronal glucose metabolism. *Acta Physiol. Scand.* 167, 275-284.

Fillenz M., The role of lactate in brain metabolism. (2005). *Neurochem Int.* 47, 413-417.

Fox P.T., Raichle M.E., Mintun M.A., Dence C. Non oxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. (1988). *Science* 241,462–464.

Gal S., Zheng H., Fridkin M., Youdim M.B., (2005) Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion. *J Neurochem.* 95, 79-88.

- Greenamyre J.T.**, Sherer T.B., Betarbet R., Panov A.V. Complex I and Parkinson's Disease. (2001). *IUBMB Life*. **52**:135-41.
- Hastings T.G.** The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. (2009). *J Bioenerg Biomembr*. 41(6):469-72.
- Hastings T.G.**, The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. (2009). *J Bioenerg Biomembr*. 41, 469-472.
- Hediger M.A.** New view at C. (2002). *Nat. Med.*, 8, 445-446.
- Hindle J.V.** Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. (2010) *Age and Ageing*. 39:156–161.
- Ilinoiu, E. C.;** Manea, F.; Serra, P. A.; Pode, R. Simultaneous/Selective Detection of Dopamine and Ascorbic Acid at Synthetic Zeolite-Modified/Graphite-Epoxy Composite Macro/Quasi-Microelectrodes. (2013). *Sensors.*, 13 (6), 7296- 7307.
- Jana S.**, Sinha M., Chanda D., Roy T., Banerjee K., Munshi S., Patro B.S., Chakrabarti S. Mitochondrial dysfunction mediated by quinone oxidation products of dopamine: Implications in dopamine cytotoxicity and pathogenesis of Parkinson's disease. (2011). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1812:663–673.
- Kandel E.R.**, J. H. Schwartz, T. M. Jessel, Principi di Neuroscienze.(2007) CEA.
- Kirik D.** and Bjorklund A. Modeling CNS neurodegeneration by overexpression of disease-causing proteins using viral vectors. (2003). *Trends in neuroscience*, 26(7), 386-392.
- Klein C.**, Djarmati A., Hedrich K., Schäfer N., Scaglione C., Marchese R., Kock N., Schüle B., Hiller A., Lohnau T., Winkler S., Wieggers K., Hering R., Bauer P., Riess O., Abbruzzese G., Martinelli P., Pramstaller P.P. PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. (2007). *Eur J Hum Genet*. 13(9):1086-93.
- Lang A.E. and Lozano A.M.**, Parkinson's disease. Second of two parts. (1998). *N Engl J Med*, 339 (16): 1130-1143.
- Leon, L. R.;** Walker, L. D., DuBose, D. A.; Stephenson, L. A. (2004). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 286 (5), R967-974.
- Lowry J.P.**, Miele M., O'Neill R.D., Boutelle M.G., Fillenz M. (1998). An amperometric glucose oxidase/poly(o-phenylenediamine) biosensor for monitoring brain extracellular glucose: In vivo characterisation in the striatum striatum of freelymoving rats. *J. Neurosci. Methods*, 79, 65-74. Name of the book (Header position 1,5) 22

- Magistretti P.J.**, Pellerin L., Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. (1999). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354 (1387), 1155– 1163.
- Magistretti P.J.**, Pellerin L., Rothman D.L., Shulman R.G. (1999). Energy on demand. *Science*, 283, 496-497.
- Malkus K.A.**, Tsika E., Ischiropoulos H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle.(2009). *Mol Neurodegener.* 4:24.
- Martin J.H.** (2005) Neuroanatomia. McGraw-Hill Italia
- Martinez- Morales P.L.** and Liste I. Stem Cells as In Vitro Model of Parkinson's Disease. (2012). *Stem Cells Int*,1-7.
- McMahon C.P.**, Rocchitta G., Serra P.A., Kirwan S.M., Lowry J.P., O'Neill R.D.. The efficiency of immobilised glutamate oxidase decreases with surface enzyme loading: an electrostatic effect, and reversal by a polycation significantly enhances biosensor sensitivity. (2006) *Analyst*, 131(1), 68-72.
- Miele M.**, Esposito G., Migheli R., Sircana S., Zangani D., Fresu G.L, Desole M.S. Effects of allopurinol on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurochemical changes in the striatum and in the brainstem of the rat. (1995). *Neurosci Lett.* 183(3), 155-159.
- Miele, M.;** Fillenz, M. In vivo determination of extracellular brain ascorbate. (1996) *J Neurosci Methods.*, 70 (1),15-19.
- Miele, M.;** Mura, M. A.; Enrico, P.; Esposito, G.; Serra, P. A.; Migheli, R.; Zangani, D.; Miele, E.; Desole, M. S. On the mechanism of d-amphetamine-induced changes in glutamate, ascorbic acid and uric acid release in the striatum of freely moving rats. (2000) *Br J Pharmacol*, 129 (3), 582-588.
- Migheli R.**, Puggioni G., Dedola S., Rocchitta G., Calia G., Bazzu G., Esposito G., Lowry J.P., O'Neill R.D., Desole M.S., Miele E., Serra P.A. Novel integrated microdialysis–amperometric system for in vitro detection of dopamine secreted from PC12 cells: Design, construction, and validation. (2008). *Anal Biochem*, 380: 323–330.
- Miller R.L.**, James-Kracke M., Sun G.Y., Sun A.Y. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. (2009)*Neurochem Res.* 34(1):55-65.
- Morita, H.**, Abe, C.; Awazu, C.; Tanaka, K. Long-term hypergravity induces plastic alterations in vestibulo-cardiovascular reflex in conscious rats. (2007)*Neurosci Lett.*, 412 (3), 201-205

Murphy D.L., Lipper S., Slater S., Shiling D. Selectivity of clorgyline and pargyline as inhibitors of monoamine oxidases A and B in vivo in man. (1979). *Psychopharmacology (Berl)* 62, 129- 132.

Nicholson G., Pereira A.C., Hall G.M. Parkinson's disease and anesthesia. (2002) *Br. J. Anaesth.*, , 89 (6), 904-916.

O'Neill R.D. Long-Term Monitoring of Brain Dopamine Metabolism In Vivo with Carbon Paste Electrodes. (2005) *Sensors.*; 5(6):317-342.

Pagnacco G. Oggero E., Morr D.R., Berme N. Oversampling data acquisition to improve resolution of digitized signals. (1997). *Biomed. Sci. Instrum.*, 34, 137–142.

Pai K.S., Ravindranath V. Protection and potentiation of MPTP-induced toxicity by cytochrome P-450 inhibitors and inducer: in vitro studies with brain slices. (1991). *Brain Res.* 555(2):239-244.

Palombo E., Porrino L.J., Crane A.M., Bankiewicz K.S., Kopin I.J., Sokoloff L. Cerebral metabolic effects of monoamine oxidase in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine acutely treated monkeys. . (1991). *J. Neurochem.* 56, 1639–1646.

Pantano P. & Kuhr, W.G. Electroanalysis, (1995). 7, 405.

Parkinson, J., An essay on the shaking palsy. London: Sherwood, Neely and Jones, 1817 Paternoster Row.

Paxinos G. & Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, (2007). 6th Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA.

Petrovitch H., Ross G. W., Abbott R.D., Sanderson W.T., Sharp D.S., Tanner C.M., Masaki K.H., Blanchette P.L., Popper J.S., Foley D., Launer L., White L.R. Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. (2002). *Arch Neurol* 59:1787-1792 .

Przedborski S., Jackson-Lewis V., Djaldetti R., Liberatore G., Vila M., Vukosavic S., Almer G. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. (2000). *Restor Neurol Neurosci.* 16(2):135-142,

Rice M.E. (2000). Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.*, 23, 209-216.

Rocchitta G. Migheli R., Dedola S., Calia G., Desole M.S., Miele E.; Lowry J.P., O'Neill R.D., Serra P.A. Development of a distributed, fully automated, bidirectional telemetry system for amperometric microsensor and biosensor applications. (2007). *Sens. Actuat. B*, 126, 700-709.

Dott.ssa Maria Domenica Alvau - Effetti della neurotossina MPTP e protezione da parte della pargilina sui metaboliti energetici extracellulari e sui livelli di dopamina nello striato in ratti "freely moving". -Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Indirizzo Neuroscienze -XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

- Rocchitta G.**, Secchi O., Alvau M.D., Farina D., Bazzu G., Calia G., Migheli R., Desole M.S., O'Neill R.D. and Serra P.A. (2013). Simultaneous telemetric monitoring of brain glucose and lactate, and motion in freely-moving rats, *Analytical Chemistry*.
- Rocchitta, G.**; Secchi, O.; Alvau, M. D.; Migheli, R.; Calia, G.; Bazzu, G.; Farina, D.; Desole M.S.; O'Neill R.D.; Serra, P.A. (2012) Development and Characterization of an Implantable Biosensor for Telemetric Monitoring of Ethanol in the Brain of Freely Moving Rats, *Anal Chem*, 84, 7072- 7079.
- Sauer H.**, Oertel W.H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. (1994) *Neuroscience* 59: 401-415.
- Schapira A.H.** and Jenner P. Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. (2011) *Movement Disorders*. 26(6).
- Scheller F. W.**, Schubert, F., Fedrowitz J. Present state and frontiers in biosensorics. (1997). *EXS*, 80, 1-9.
- Schuvailo, O. M.**; Soldatkin, O. O.; Lefebvre, A.; Cespuglio, R.; Soldatkin, A. P. Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate. (2006), *Anal Chim Acta*. 573-574, 110-116.
- Serra P.A.**, Rocchitta G., Bazzu G., Manca A., Puggioni, G.M., Lowry J.P., O'Neill R.D. Design and construction of a low cost single-supply embedded telemetry system for amperometric biosensor applications. (2007). *Sens. Actuat B*, 122, 118-126.
- Serra P.A.**, Sciola L., Delogu M.R., Spano A., Monaco G., Miele E., Rocchitta G., Miele M., Migheli R., Desole M.S. (2002). The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induces apoptosis in mouse nigrostriatal glia. Relevance to nigral neuronal death and striatal neurochemical changes. *J Biol Chem.*, 277, 34451- 34461.
- Serra PA.**, Pluchino S., Marchetti B., Desole M.S., Miele E. The MPTP mouse model: Cues on DA release and neural stem cell restorative role. (2008). *Parkinsonism Relat Disord*, 14:189-193.
- Sherer T.B.**, Betarbet R., Greenamyre J. T. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. (2002) *J Neurosci* 22: 7006-7015.

- Sherer T.B.**, Betarbet R., Testa C.M., Seo B.B., Richardson J .R., Kim J. H., Miller G.W., Yagi T., Matsuno-Yagi A., Greenamyre J.T. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. (2003) *J Neurosci* 23: 10756-10764.
- Singh Y.**, Swanson E., Sokoloski E., Kutty R.K., Krishna G. MPTP and MPTP analogs induced cell death in cultured rat hepatocytes involving the formation of pyridinium metabolites. (1988). *Toxicol Appl Pharmacol.* 96, 347-359.
- Soldatkin O.O.**, Schuvailo O.M., Marinesco S., Cespuglio R., Soldatkin A.P. Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection. (2009). *Talanta* 78 1023–1028.
- Takeda, M.** Intrathecal infusion of brain-derived neurotrophic factor protects nigral dopaminergic neurons from degenerative changes in 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine-induced monkey parkinsonian model. (1995). *Hokkaido Igaku Zasshi* 70, 829–838.
- Thomas B.**, Beal M.F. Molecular insights into Parkinson's disease. (2011). *F1000 Med Rep.* 3:7.
- Thomas B., Beal M.F.** Parkinson's disease. (2007). *Hum Mol Genet.* 16 (Spec No. 2):183-194.
- Tomac, A.**, Lindqvist, E., Lin, L.F., Ogren, S.O., Young, D., Hoffer, B.J., Olson, L., Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. (1995). *Nature* 373, 335–339.
- Treccani**, Enciclopedia italiana, (2010) *Dizionario della medicina.*
- Ungerstedt U.**, Ljungberg T., Steg G. Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine neurons. (1974) *Adv Neurol* 5: 421-426.
- Valente E.M.**, Ferraris A., Dallapiccola B. I parkinsonismi genetici. (2007). XXXVIII Congresso della Società italiana di Neurologia Firenze.
- Watanabe Y.**, Hyllbrant B.B., Langstrom B. Tracing oxygen metabolism by use of positron emitter Oxygen-15. (1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 231, 131-134.
- Watanabe, H.**, Muramatsu, Y., Kurosaki, R., Michimata, M., Matsubara, M., Imai, Y., Araki, T., Protective effects of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in mouse brain against MPTP neurotoxicity: an immunohistological study. (2004). *Eur Neuropsychopharmacol* 14, 93–104.

Wightman R.M., Robinson D.L. Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with 'reward'.(2002).*J Neurochem.* 82(4):721-35. Review.

Wolfensohn S. & Lloyd M. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, (2003). 3rd Ed.; Blackwell Publishing: Cornwall, ON, Canada.

Wu R.M., Chen R.C., Chiueh C.C. Effect of MAO-B inhibitors on MPP⁺ toxicity in vivo . (2000). *Ann N Y Acad Sci.* 899, 255–261.

Zhu G., Huang Y., Chen Y., Zhuang Y., Behnisch T., MPTP modulates hippocampal synaptic transmission and activity-dependent synaptic plasticity via dopamine receptors. (2012). *J Neurochem.* 122 (3), 582–93.