



Università degli Studi di Sassari
Scuola di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche
(Direttore: Prof. Bruno Masala)
Indirizzo: Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare
Clinica
(Tutor: Prof. Luca Deiana)

**Sviluppo di un nuovo sistema microfluidico-
amperometrico per lo studio della secrezione
di dopamina in cellule PC12 utilizzando un
microsensore nanostrutturato**

Tutor: Prof. Luca Deiana

Co-tutor: Prof. Pier Andrea Serra

Tesi di Dottorato di Antonella Bacciu

Anno Accademico 2011-2012

Sommario

Sommario.....	i
1. SCOPO DELLA RICERCA	1
2. INTRODUZIONE	3
2.1. Malattia di Parkinson.....	3
2.2. Determinazione elettrochimica della DA.....	8
2.3. PC12	11
2.4. Tecniche voltammetriche.....	15
2.5. Microdialisi.....	19
3. MATERIALI E METODI	23
3.1. Reagenti e soluzioni.....	23
3.2. Materiali e componenti elettronici	24
3.3. DCP (dual channel potentiostat): disegno e costruzione	25
3.4. Firmware e software	26
3.5. Sensore nanostrutturato per la DA.....	27
3.6. Cella elettrochimica sotto flusso (F-TEC).....	29
3.7. Sviluppo dei sensori nanostrutturati	31
3.8. Costruzione del tubo capillare per la microdialisi in vitro.....	35
3.9. Drug reservoir e fluid mixer	38
3.10. Solubilizzazione dei carbonanotubi	40
3.11. Coltura cellulare.....	44
3.12. Procedura sperimentale.....	45
3.13. Analisi cromatografica del microdializzato ottenuto dalla sospensione di cellule PC12	46
3.14. Saggio di vitalità cellulare	46
3.15. Analisi statistica.....	47

4. RISULTATI.....	48
4.1. Caratterizzazione statica dei differenti disegni di sensore per la DA	48
4.2. Caratterizzazione statica e dinamica della cella elettrochimica contenente il sensore nano strutturato per la DA.....	52
4.2. Effetti di concentrazioni crescenti di DA in camera microdialitica e del flusso di perfusione sulle correnti di DA.....	54
4.3. Effetto del numero delle PC12 sul rilascio di DA	56
4.4. Effetto del KCl sulla secrezione di DA in presenza o meno di Ca ²⁺ extracellulare	57
4.5 Effetto della nicotina sul rilascio di DA in presenza di mecamilamina.....	59
4.6. Vitalità delle PC12 prima e dopo gli esperimenti di microdialisi.....	62
5. DISCUSSIONE	63
5.1. Microelettronica e caratteristiche elettrochimiche del microsensore della DA	63
5.2. Secrezione di DA da parte delle cellule PC12	65
5.3. Vitalità cellulare.....	67
6. CONCLUSIONI	69
7. BIBLIOGRAFIA	70

1. SCOPO DELLA RICERCA

La malattia di Parkinson (MP) è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da una perdita del tono dopaminergico nel compartimento striatale cerebrale. Lo studio *in vitro* della secrezione della dopamina (DA) impiegando una grande varietà di tecniche è risultato molto utile per chiarire l'effetto di diversi farmaci senza la necessità d'impiego di animali da esperimento. Lo scopo del presente studio è quello di valutare la performance di un doppio sistema microdialitico *in vitro* associato a sensori elettrochimici per la determinazione dinamica della DA secreta dalle cellule PC12 (Migheli et al., 2008). Questo sistema, derivato da un precedente disegno (Hebel e Serra, 2008; Serra et al., 2007), è stato ottimizzato attraverso l'integrazione di sensori nanostrutturati con nanotubi al carbonio. Per la fabbricazione dei sensori sono stati utilizzati i multiwalled carbon nanotubes (MWCNT). Il sistema microdialitico è stato testato in differenti condizioni sperimentali e il sensore nanostrutturato è stato calibrato con differenti concentrazioni di DA. Sono stati condotti diversi esperimenti trattato-controllo per rilevare la secrezione di DA indotta da farmaci quali KCl e nicotina. Questo sistema potrebbe rappresentare un modello rapido e affidabile per lo studio degli effetti di diversi farmaci sulla secrezione di DA da parte delle cellule PC12. Anziché consentire la quantificazione di una singola esocitosi (Sasakawa et al., 2005) o la secrezione di DA dalla singola cellula (Green et al., 2001) questo sistema permette di studiare gli effetti di differenti farmaci su una popolazione cellulare ($\sim 10^6$ cellule) e di

eseguire una comparazione diretta dell'aumento della DA extracellulare rilasciata dalle cellule in un esperimento trattato-controllo.

L'ulteriore miniaturizzazione dell'elettronica e l'integrazione con pompe ultraminiaturizzate potrebbe consentire la realizzazione di un sistema a basso costo per un rapido screening sugli effetti *in vitro* di farmaci che modifichino la secrezione dopaminergica. Potrebbero essere studiati inoltre differenti tipi cellulari e il sensore per la DA potrebbe essere sostituito con sensori che consentono il rilevamento *in vitro* di altre importanti molecole, come il nitrossido, il glutammato, il glucosio e il lattato.

2. INTRODUZIONE

2.1. Malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson fu descritta per la prima volta da James Parkinson nel 1817, il quale definì questa patologia “Paralisi Agitante” caratterizzata da tremori involontari in parti non in movimento, con tendenza a piegare il tronco in avanti e a passare dal camminare al correre, mentre la sensibilità e l'intelligenza sembrano intatte (Parkinson, 1817). La triade di segni clinici che caratterizzano questa patologia sono la rigidità muscolare, il tremore e la bradicinesia. La rigidità muscolare deriva dalla resistenza al movimento passivo che è presente sia nei muscoli flessori che in quelli estensori. Il tremore è di tipo statico in quanto si manifesta a riposo, si esalta negli stati di ansia e si riduce o scompare del tutto durante l'esecuzione del movimento o durante il sonno. La bradicinesia è caratterizzata dalla difficoltà ad iniziare o terminare un particolare movimento. Sulla base di questa descrizione si può comprendere come molti soggetti anziani, presentano le manifestazioni tipiche della MP. Questa patologia neurodegenerativa è molto frequente, infatti ogni anno compaiono 20 nuovi casi di malattia ogni 100.000 abitanti, interessa i due sessi in eguale maniera e colpisce tutte le razze (Yahr, 1986). La MP colpisce soggetti di età superiore ai 40 anni (Marsden, 1981). In un recente studio di Bennett e coll. (1996), eseguito su soggetti di età superiore ai 65 anni, il 34% erano parkinsoniani, con un aumento progressivo della prevalenza della malattia all'aumentare dell'età (65-74, 14.9%; 75-84, 29.5%; >

85 anni, 52,4%). Negli ultimi anni sono stati scoperti numerosi farmaci in grado di attenuare la sintomatologia parkinsoniana anche se questi permettono di controllare i sintomi della malattia, ma non di rallentare definitivamente la progressione. La MP è la più frequente tra le malattie degenerative del Sistema Nervoso Centrale (SNC). Nel cervello dei pazienti affetti avviene una scomparsa progressiva dei neuroni dopaminergici della *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc), neuroni localizzati nella porzione antero-superiore del mesencefalo (Fig. 1).

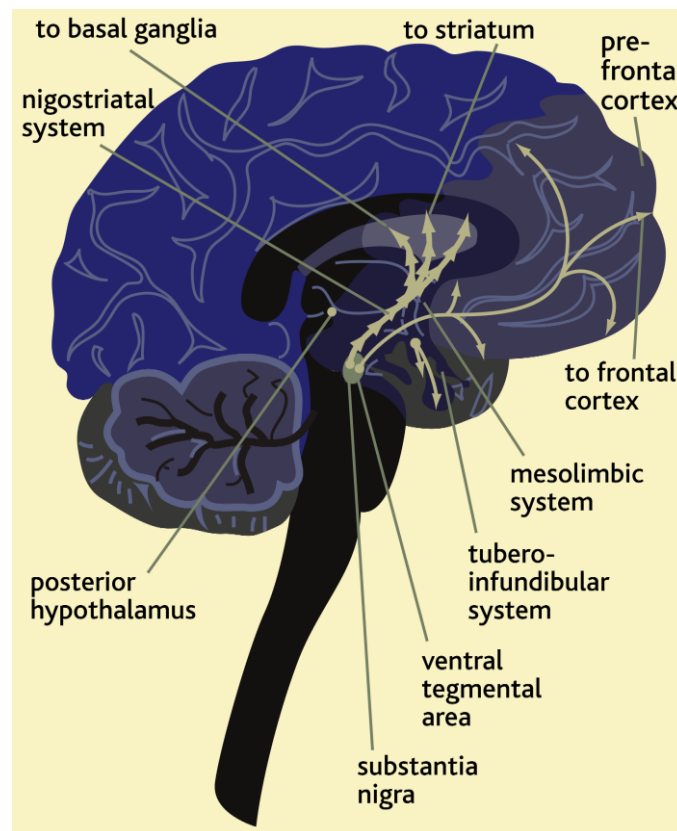


Fig. 1 Schema rappresentativo dei nuclei che costituiscono i gangli della base compresi la SNpc ed il nucleo caudato, che costituisce, assieme ad altri nuclei il corpo striato, sede delle terminazioni dopaminergiche della via nigro-striatale.

Nei pazienti parkinsoniani quest'area si presenta fortemente depigmentata e le cellule che la compongono sono degenerate e sostituite da cellule gliali. Dalle cellule della SNpc si dipartono terminazioni nervose che attraverso sinapsi entrano in contatto con i neuroni dello striato, un nucleo dei Gangli della Base. Queste terminazioni costituiscono la via nigrostriatale che fa parte del sistema extrapiramidale, deputato al controllo di movimento, postura ed equilibrio (Fig. 2).

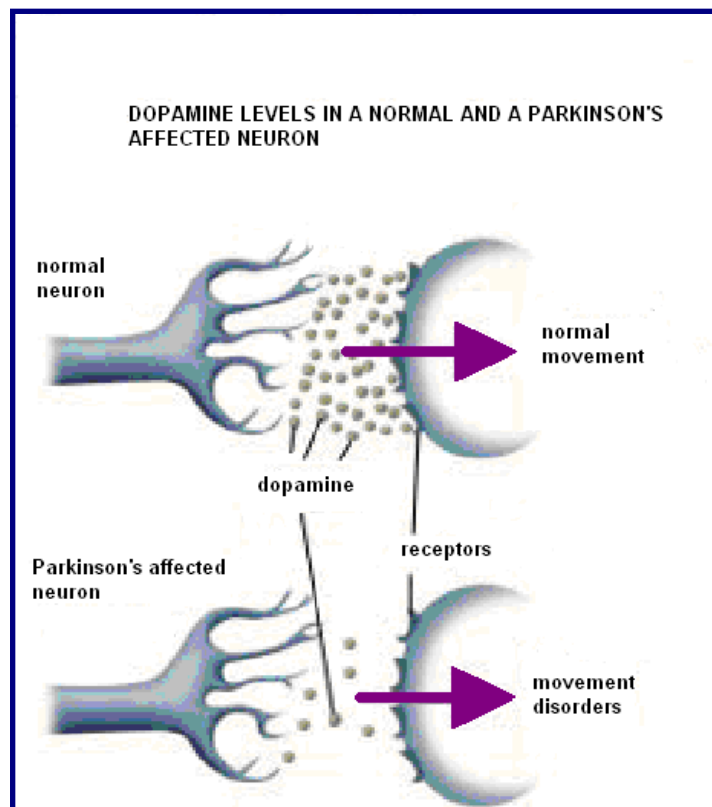


Fig. 2 Disegno semplificato della terminazione nervosa e del funzionamento della sinapsi. Dalle vescicole presinaptiche si libera dopamina nello spazio sinaptico. Le cellule della SNpc sintetizzano il neurotrasmettitore DA che viene meno nel paziente parkinsoniano in cui si ha la degenerazione di queste cellule. Ciò comporta tutta una serie di modificazioni cliniche che sono tipiche in questi pazienti.

Nella MP la carenza di DA non è esclusiva della SNpc, ma interessa anche il tetto del mesencefalo, il locus coeruleus ed il nucleo dorsale del vago che contengono pigmenti neuronali (Hornykiewicz, 1973). Lo studio del materiale autoptico del paziente permette di rilevare una evidente decolorazione della SNpc, indice della distruzione di tali cellule. Microscopicamente è possibile inoltre osservare delle alterazioni caratteristiche delle cellule nigrali integre, costituite dai corpi di Lewy (descritti per la prima volta nel 1908 da Frederic Lewy). In condizioni normali, i neuroni della SNpc diminuiscono progressivamente con l'età; infatti da circa 400-500.000 possono arrivare a circa 200.000 dopo gli 80 anni di età. Nei pazienti parkinsoniani il numero dei neuroni è inferiore a 100.000. Affinché si manifestino i primi segni di malattia, è necessario che almeno l'80% dei neuroni dopaminergici siano degenerati (Hassler, 1938).

L'attività dopaminergica striatale è mediata da specifici recettori metabotropi. I recettori per la DA (D1-D5), presenti nello striato, appartengono tutti alla famiglia dei recettori associato alla proteina G. Questi vengono raggruppati, in base alla loro attività funzionale, in due categorie: i D1, che comprendono i recettori D1 (Dearry et al., 1990; Zhou et al. 1990; Sunahara et al. 1990; Monsma et al., 1990) e D5 (Sunahara et al. 1991), e i D2, che comprendono i recettori D2 (Grandy et al., 1989), D3 (Sokoloff et al. 1990) e D4 (Van Tol et al., 1991). I D1 attivano l'adenilato-ciclastasi, inducendo un aumento del cAMP e sono localizzati in sede postsinaptica. I D2 sono anch'essi postsinaptici ed inibiscono l'attività dell'adenilato-ciclastasi, inducendo una riduzione intracellulare del cAMP. Oltre a questi recettori, i neuroni dopaminergici hanno un autorecettore di tipo inibitorio

(Carlsson, 1975). Questi recettori sono localizzati sia sui corpi cellulari che sulle terminazioni presinaptiche dei neuroni dopaminergici e controllano la frequenza di rilascio e la liberazione di DA. La diagnosi della MP si basa sui sintomi caratteristici della malattia e sulla capacità di inquadrarli in correttamente.

Le sindromi parkinsoniane, sono caratterizzate da una somiglianza clinica con la MP, ma se ne distinguono per l'eterogeneità eziologica e per i criteri clinico-patologici necessari per la diagnosi. Esistono differenti tipi di parkinsonismi atipici: iatrogeni (indotti da neurolettici o da antagonisti della DA); neurotossici (indotti da 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina, MPTP); genetici (PARK1 e PARK2); quelli che comprendono la Paralisi Sopranucleare Progressiva (PSP), l'Atrofia Sistemica Multipla (ASM) e la demenza con i corpi di Lewy. Al momento non esiste una terapia capace di sconfiggere definitivamente la malattia, infatti l'unica terapia consiste nel controllo dei sintomi dopo la loro comparsa. Gran parte dei risultati positivi ottenuti in questo campo sono legati alla scoperta della fisiopatogenesi della malattia e alla conseguente introduzione in terapia della L-DOPA che rappresenta ancora oggi il farmaco di eccellenza nella cura di tale malattia.

2.2. Determinazione elettrochimica della DA

La dopamina è un neurotrasmettitore che appartiene alla classe delle catecolamine e viene sintetizzata a partire dall'aminoacido tirosina (Tyr) attraverso una via biosintetica che comprende gli enzimi tirosina-idrossilasi e decarbossilasi degli aminoacidi aromatici. Il primo enzima, la tirosina idrossilasi, trasforma l'aminoacido Tyr in L-diidrossifenilalanina (L-DOPA) ed è l'enzima che limita la velocità di sintesi della DA. E' presente in tutte le cellule che producono catecolamine. L'L-DOPA viene successivamente decarbossilata a DA e CO₂ (Fig. 3).

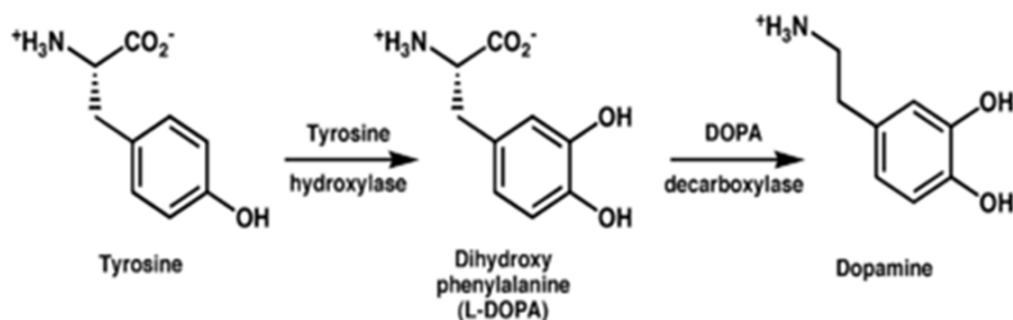


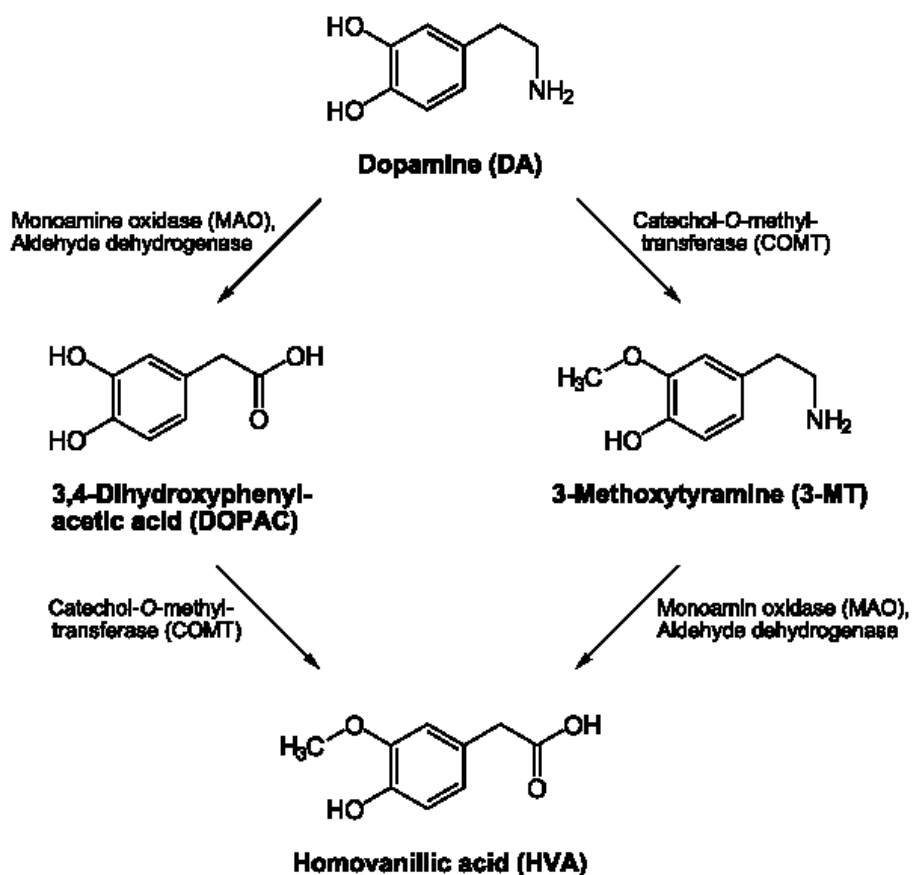
Fig. 3 Via biosintetica della DA, che comprende una idrossilazione e una successiva decarbossilazione attraverso gli enzimi tirosina-idrossilasi e decarbossilasi DOPA.

Nel SNC, la DA è implicata nelle funzioni cognitive (O'Neill, 2005) nella *via della ricompensa* (Wightman e Robinson, 2002) e nella MP (Rocchitta et al., 2004; Rocchitta et al., 2005a).

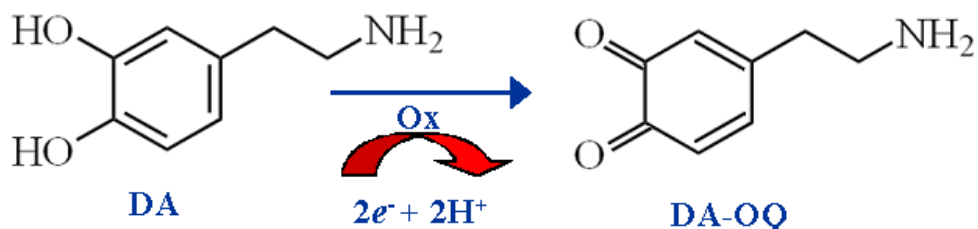
Le tappe che avvengono nella sinapsi dopaminergica sono:

1. sintesi della DA a partire dalla Tyr.
2. accumulo di DA nei dei granuli di riserva
3. liberazione della DA
4. interazione con il recettore
5. re-uptake per la successiva metabolizzazione e inattivazione.

L'azione della DA termina con il reuptake nelle terminazioni presinaptiche. La DA libera, presente nelle terminazioni presinaptiche, viene degradata dagli enzimi monoaminossidasi A e B (MAO-A e MAO-B). Essi sono localizzati sia nella membrana mitocondriale che nel neurone dopaminergico. La DA viene anche inattivata dagli enzimi Catecol-O-metil-transferasi (COMT), localizzati all'esterno del neurone presinaptico.



I processi biochimici della DA sono stati studiati sia *in vivo* che *in vitro* utilizzando diverse tecniche tra cui la microdialisi (Chiou et al., 2007; Rocchitta et al., 2005b; Serra et al., 2003a; Serra et al., 2003b) e la voltammetria (Gordito et al., 2003). La DA viene ossidata a dopamina ortochinone (DA-OQ) come mostrato dalla seguente reazione:



Questa reazione può aver luogo sulla superficie di elettrodi in grafite che, se ricoperti di una membrana policationica come il Nafion[®], mostrano una buona selettività nei confronti degli anioni elettrochimicamente ossidabili (Joyce et al., 2007; Doherty et al., 1996).

2.3. PC12

Una grande varietà di tecniche sono state utilizzate per comprendere i meccanismi di secrezione e rilascio della DA *in vitro* e la più utilizzata tra queste prevede l'uso della linea cellulare PC12. Questa linea cellulare derivata dal feocromocitoma di ratto è comunemente usata nei modelli *in vitro* per comprendere i meccanismi fisiologici, biochimici e molecolari alla base dei processi degenerativi delle cellule catecolaminergiche, in quanto capace di sintetizzare, secernere e metabolizzare la DA (Fornai et al., 2007; Sasakawa et al., 2005; Green et al., 2001). Questa linea cellulare è stata impiegata in diversi studi per comprendere i meccanismi dell'omeostasi ossidativa della DA *in vitro* (Rocchitta et al., 2005b; Serra et al., 2003b).

La linea cellulare PC12 è stata originariamente isolata dalla midollare del surrene di ratto nel 1976 (Greene e Tischler, 1976). Come le cellule surrenali cromaffini, le PC12 sintetizzano la dopamina (DA) e anche la noradrenalina (NA) che rilasciano in seguito a depolarizzazione della membrana con un meccanismo Ca²⁺ dipendente (Greene e Rein, 1977). Le PC12 hanno un fenotipo simile ai neuroni dei gangli simpatici e possono essere coltivate infinitamente dopo

differenziazione con il fattore di crescita nervoso (NGF). L'attività della tirosina idrossilasi (TH) in queste cellule può essere aumentata con l'NGF, l'insulina, i glucocorticoidi e la tossina del colera (Schubert et al. 1980; Tischler et al. 1983). Anche se la catecolamina presente in quantità maggiore nelle PC12 è la DA, l'aggiunta di acido ascorbico può portare alla produzione di quantità limitata di noradrenalina in alcune sottocolture di PC12 (Schubert e Klier 1977, Tischler et al. 1983). Le PC12 possiedono grandi vescicole (LDCVs), che contengono catecolamine e acetilcolina che è immagazzinata in piccole vescicole chiare (Greene e Tischler 1976; Schubert et al. 1980, Travis e Wightman 1998). Le LDCVs nelle PC12 sono leggermente più piccole (75-120 nm raggio; Greene e Tischler 1976, Schubert et al. 1980; Travis e Wightman, 1998) rispetto a quelle delle cellule cromaffini della midollare del surrene (170 nm raggio; Coupland, 1968). Nonostante l'ampio uso di cellule PC12 per studiare la fisiologia e la vulnerabilità dei neuroni centrali della DA, l'anatomia neurochimica di questa linea cellulare, rispetto ai neuroni dopaminergici, non è mai stata esplorata in dettaglio. Questa linea cellulare viene spesso usata come un modello *in vitro* per capire la fisiologia dei neuroni centrali della DA (Roda et al., 1980, Tischler 2002). Diversi fattori contribuiscono al largo uso delle cellule PC12: esse infatti, sono economiche, facili da coltivare e mimano molti aspetti dei neuroni centrali della DA in quanto producono catecolamine (Vaccaro et al., 1980, Roda et al., 1980). In particolare, oltre a contenere DA (Greene e Rein, 1978), possiedono i suoi recettori sulla membrana esterna (Sampath et al., 1994). La presenza della DA, dei suoi recettori e dei meccanismi di reuptake rende queste

cellule più paragonabili alle terminazioni dopaminergiche rispetto alle cellule da cui derivano (cellule cromaffini della midollare del surrene) (Fig. 4). Questo concetto è rinforzato dalla presenza della isoforma A delle monoaminoossidasi (MAO) di tipo A, caratteristica solo ai neuroni dopaminergici (Finberg e Youdim, 1983), mentre nelle cellule cromaffini della midollare del surrene prevalgono le MAO di tipo B (Youdim, 1991).

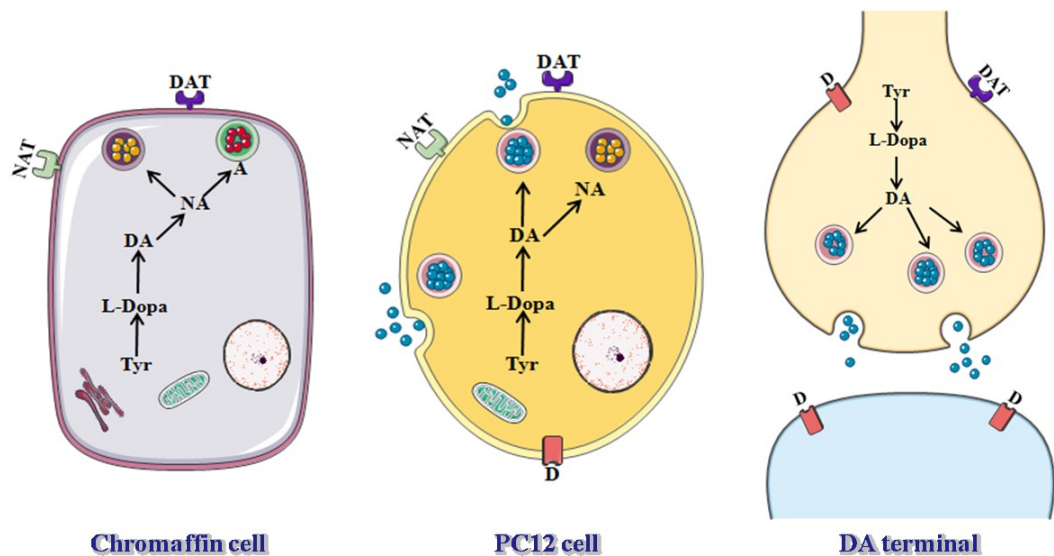


Fig.4. Rappresentazione schematica di una cellula PC12, una cellula cromaffine della midollare del surrene e una terminazione dopaminergica

La linea cellulare PC12 rappresenta quindi un modello per valutare la neurotossicità di una serie di composti che agiscono sui neuroni centrali della DA con significative implicazioni per il trattamento dei disordini neurologici.

La tecnica amperometrica è stata utilizzata per studiare l'effetto di differenti meccanismi di stimolazione sulla latenza dell'esocitosi dalle cellule PC12 dopo stimolazione (Zerby & Ewing 1996b). Le cellule PC12 possiedono sia i recettori nicotinici che quelli muscarinici per cui possono innescare l'esocitosi attraverso due meccanismi diversi al momento dell'attivazione. La nicotina determina l'apertura dei canali del sodio, che si traduce in una depolarizzazione della membrana cellulare sufficiente per aprire i canali del calcio voltaggio-dipendenti, permettendo così il rapido afflusso di calcio e la successiva liberazione di DA (Stallcup 1979). I recettori muscarinici agiscono attraverso secondi messaggeri intracellulari determinando il rilascio del calcio dalle riserve intracellulari e la conseguente esocitosi (Berridge & Irvine 1984). Per ottenere una rapida e diretta depolarizzazione della membrana cellulare e innescare il processo di esocitosi può essere utilizzato il KCl. Il contenuto di catecolamine nelle vescicole è inalterata da questi stimoli, ma il tempo tra l'applicazione della stimolazione e la secrezione di DA variano in modo significativo (Zerby & Ewing 1996b). Le PC12 sono ritenute attualmente un valido sistema di previsione degli effetti indotti da un dato trattamento *in vivo*, nonostante alcune caratteristiche della loro fisiologia cellulare le diversifichino dai neuroni catecolaminergici.

2.4. Tecniche voltammetriche

Le tecniche voltammetriche sono una importante sottoclasse delle tecniche elettrochimiche a potenziale controllato, che a loro volta costituiscono il più cospicuo segmento scientifico-analitico del maggior settore dell'analisi chimica strumentale: le tecniche elettrochimiche. In linea di principio, l'analisi strumentale si basa sull'assunto di correlare in termini biunivoci l'osservazione di una variabile fisica con la concentrazione di una sostanza chimica o con una grandezza ad essa strettamente correlata. Le tecniche elettrochimiche sono caratterizzate dal fatto che la grandezza fisica in gioco è di tipo elettrico (potenziale, corrente, resistenza elettrica, carica elettrica o grandezze da queste derivate). In funzione della zona di spazio interessata al fenomeno elettrochimico in osservazione, della presenza dell'equilibrio elettrochimico e del tipo di perturbazione che si induce nel sistema elettrodico a contatto con la matrice in analisi, è possibile creare un elevato numero di esperimenti elettrochimici differenti, e ciascuno di essi permette di implementare un diverso gruppo di tecniche di analisi. Nello specifico, l'approccio voltammetrico permette di ottenere un insieme di tecniche a valenza analitica o di indagine molecolare caratterizzate da: I) il decorso del processo elettromotore all'interfase tra elettrodo e soluzione ad esso immediatamente circostante; II) un passaggio finito di corrente all'interno del sistema elettrochimico, determinato da III) una polarizzazione elettrodica. Nella voltammetria propriamente detta, una rampa lineare di potenziali viene applicata ad uno specifico elettrodo

(d'ora in poi chiamato elettrodo lavorante, WE) su cui si vuole che avvenga un processo redox che coinvolge l'analita (o una specie ad esso stechiometricamente riconducibile). Il potenziale di WE può essere misurato accuratamente solo se riferito ad un elettrodo impolarizzabile, chiamato elettrodo di riferimento, RE, e collegato all'elettrodo lavorante con un circuito potenziometrico (in cui il passaggio di corrente è pressoché nullo). La corrente che fluisce su WE in conseguenza al decorso del processo elettromotore attraversa anche un terzo elettrodo, chiamato contro elettrodo, CE: esso è sede di un processo elettrodico complementare a quello monitorato su WE, ma che generalmente non viene sottoposto ad alcun tipo di indagine. L'attenzione nei processi voltammetrici è quindi interamente focalizzata su quanto avviene all'elettrodo lavorante. Gli elettrodi lavoranti possono essere abbastanza diversi per natura chimica, forma e dimensione. In genere essi sono costituiti da metalli (tipicamente Pt, Au, Hg, Ag) o da elementi non metallici (quali il carbonio in diverse sue forme allotropiche conduttive). Le morfologie più comuni sono quelle dei dischi, dei fili e delle bande, mentre le dimensioni del materiale elettrodico possono tipicamente variare da qualche millimetro sino a alcune decine di nanometri.

Se natura del materiale e morfologia elettrodica sono fattori importanti, un ruolo ancora maggiore viene svolto dalla dimensione elettrodica. Questa modula il meccanismo diffusivo di trasporto di materia all'elettrodo (diffusione lineare semiinfinita per le dimensioni maggiori, diffusione sferica o puntiforme per quelle minori), il valore assoluto della corrente circolante sul sistema elettrodico e, di converso, quello della caduta ohmica non compensata (pari $V_{unc} =$

$R_{sol}I$, ove I = corrente circolante nel sistema e R_{sol} = resistenza della soluzione) e della corrente capacitiva, ossia la corrente necessaria per caricare il doppio strato elettrico costituito da elettrodo e strato della soluzione ad esso immediatamente adiacente. Lavorare con elettrodi di piccole dimensioni (pari o inferiori a qualche decina di micron) permette di sfruttare numerosi vantaggi ma comporta anche alcuni svantaggi. Innanzitutto, il regime diffusivo di trasposto di materia in questo caso operante (diffusione sferica) è di gran lunga più efficiente rispetto a quello utilizzabile per elettrodi di maggiori dimensioni. Ciò significa che, a parità di concentrazione, la densità di corrente che fluisce su microelettrodi è più alta di quella che circola su elettrodi di dimensioni maggiori, e questo si traduce ad esempio in un'accresciuta sensibilità analitica. Questo vantaggio permette ad esempio di poter utilizzare, in condizioni convenzionali, sistemi solventi del tutto inusuali per l'elettroanalisi (come idrocarburi quali esano o toluene). Ancora, solventi convenzionali possono vantaggiosamente esser impiegati in assenza di elettrolita di supporto, la cui aggiunta è normalmente necessaria per azzerare i contributi al trasporto di materia verso l'elettrodo connessi alla migrazione di analita. I valori assoluti di corrente circolante sono tuttavia molto inferiori, e questo determina bassi valori di caduta ohmica, e quindi la non necessità di effettuarne la compensazione se si lavora a bassa velocità di scansione del potenziale. Per contro, operare con microelettrodi impone sia l'adozione di sistemi elettrochimici dotati di estrema sensibilità (o di amplificatori di corrente) che di dispositivi in grado di schermare l'interazione degli elettrodi con campi elettromagnetici, quali gabbie di Faraday. Inoltre, i microelettrodi sono di difficile reperibilità

commerciale e di non semplice realizzazione, e ciò ne limita alquanto la diffusione in ambienti non connessi al mondo della ricerca.

I costituenti principali di un moderno strumento per misure voltammetriche sono:

- un adeguato sistema di alimentazione/stabilizzazione (normalmente un trasformatore associato ad una batteria al piombo ed ad un inverter, simile a quelli che si trovano nei gruppi di continuità), volto a garantire un'alimentazione costante sia in termini di tensione che di frequenza e priva di armoniche,

- un sistema elettrochimico computerizzato che, associato con un personal computer, permetta di:

- generare la morfologia della perturbazione (in termini di tensione o di corrente) all'elettrodo lavorante;

- convertire (da digitale ad analogico) la forma d'onda prescelta al punto precedente;

- imporre, istante per istante, secondo la forma d'onda prescelta, il necessario potenziale (o la corrente) all'elettrodo lavorante: la porzione dello strumento che assolve questo fondamentale compito si chiama potenziostato.

- collegare alla cella di misura i connettori di WE, RE, CE;

- valutare le coppe corrente/tensione lette dall'elettrometro e convertirle in formato digitale;

- acquisire, processare, editare ed archiviare i files digitalizzati per ottenere i responsi voltammetrici.

Cella elettrochimica

Unico costituente esterno al sistema PC-sistema elettrochimico computerizzato, la cella è costituita da un contenitore di materiale

inerte (spesso vetro, talvolta quarzo o teflon quando si determinano metalli in tracce) nel quale sono immersi i 3 elettrodi: WE, costituito da un corpo elettrodico generalmente supportato da un tipo del materiale elettrodico prescelto, RE, spesso costituito da un elettrodo Ag/AgCl in configurazione satura; CE, normalmente costituito da un filo di platino inserito in un corpo di teflon.

Sebbene a volte essa sia dotata di specifiche caratteristiche geometriche, nella generalità delle situazioni la cella ha forma di un bicchiere conico provvisto di tappo a tenuta di gas con una serie di giunti conici per l'alloggiamento di elettrodi e dispositivi per il degasaggio e di un sistema di agitazione elettromagnetica.

Tra le tante tecniche a potenziale controllato, nello studio del quale si dà conto è stata utilizzata la tecnica elettrochimica dell'amperometria a potenziale costante (*constant potential amperometry*, CPA).

2.5. Microdialisi

La microdialisi è una tecnica che permette di recuperare o somministrare sostanze a basso peso molecolare nell'interstizio di organi o tessuti senza modificarne il volume, monitorando dinamicamente l'ambiente extracellulare ed eventuali modificazioni in risposta a stimoli esterni (Benveniste et al., 1989). Questa tecnica si basa sulla separazione di due compartimenti fluidi da parte di una membrana dialitica permeabile a specie chimiche con un basso peso molecolare. In assenza di una pressione osmotica e di un potenziale elettrico il movimento dei soluti fra i due compartimenti è dovuto

esclusivamente a diffusioni determinate dal gradiente di concentrazione. La tecnica della microdialisi consente il monitoraggio dei neurotrasmettitori e altre molecole nell'ambiente extracellulare ed è utilizzabile non solo *in vivo* ma anche *in vitro*. Questo metodo ha subito numerose modifiche ed è ora largamente utilizzato per il campionamento e la quantificazione di neurotrasmettitori, neuropeptidi e ormoni nel cervello e nei tessuti periferici.

La microdialisi si effettua tramite l'impianto di una sonda microdialitica nell'area del cervello (o di altro tessuto) che si intende monitorare; la sonda è normalmente costituita da una membrana dializzante, connessa ad un *inlet* ed un *outlet*, costantemente perfusa da un ringer nel lato interno mentre quello esterno è in diretto contatto con il liquido extracellulare. La sonda può essere considerata come un vaso sanguigno artificiale nel quale specie chimiche a basso peso molecolare diffondono secondo il proprio gradiente di concentrazione. Le molecole di interesse vengono recuperate ed analizzate. Diversi farmaci possono essere somministrati attraverso lo stesso principio. Esistono vari modelli di sonde da microdialisi, differenti per forme e complessità ma comunque riconducibili a due tipologie strutturali: sonde seriali (*transcerebral probes*) e sonde parallele (*U shaped, side by side, concentric probes*). Le sonde microdialitiche vengono comunemente utilizzate su animali anestetizzati o *freely-moving*. Una variante di queste è il capillare microdialitico utilizzato negli studi *in vitro*. La concentrazione delle molecole recuperate è funzione del rapporto fra la concentrazione delle sostanze dializzate e la concentrazione delle stesse in un medium di riferimento in cui viene posizionata la sonda. Tale rapporto, detto *recovery*, è influenzato da

molteplici fattori quali: il flusso di perfusione, il tempo di campionamento, l'area ed il cut-off della membrana dializzante, la forma, le dimensioni e il coefficiente di diffusione delle molecole, interazioni delle molecole con la membrana e infine il fattore di tortuosità λ (scostamento della diffusione delle molecole da una traiettoria rettilinea).

Per questi motivi il recovery fornisce una sottostima delle reali concentrazioni delle sostanze presenti *in vivo*. Si possono distinguere un recovery assoluto e un recovery relativo. Il primo è la quantità assoluta di sostanza recuperata per unità di tempo, essa è direttamente proporzionale al flusso, e normalmente è espressa in unità di massa (grammi). Il recovery relativo, inversamente proporzionale al flusso per unità di tempo, è generalmente espresso come percentuale del soluto precedentemente misurato in una soluzione di precalibrazione (Fig. 5).

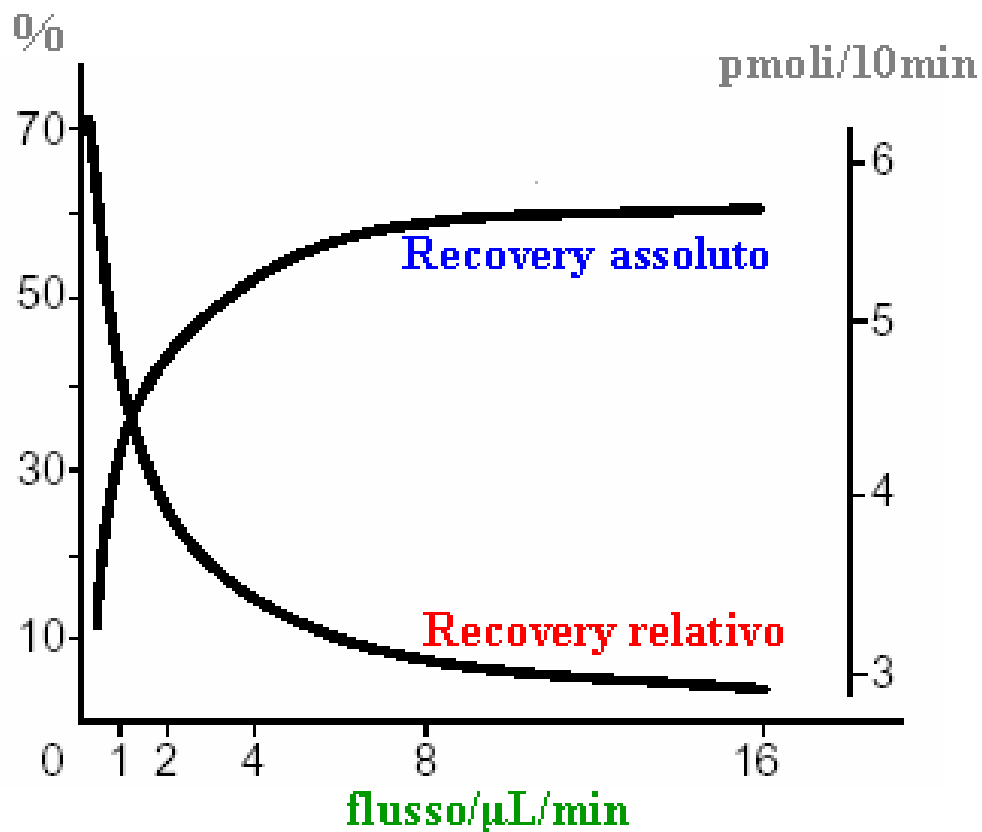


Fig. 5 Rapporto tra recovery assoluto e recovery relativo.

La tecnica della microdialisi presenta diversi vantaggi, infatti permette un monitoraggio *in situ*, è un sistema altamente specifico e consente di valutare dinamicamente le risposte agli stimoli. Gli svantaggi di questa tecnica sono dovuti sia alla sua invasività che al depauperamento dell'ambiente fisiologico. Inoltre i tempi di recupero dei campioni sono piuttosto lunghi.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Reagenti e soluzioni

Tutti i reagenti utilizzati sono stati disciolti in acqua ultrapura di grado I (Milli-Q). DA, 3-metossitiramina (3-MT), acido diidrossifenilacetico (DOPAC), acido omovanillico (HVA), acido urico (UA) e acido ascorbico (AA) sono stati acquistati dalla Sigma (Milano, Italia). La soluzione di Nafion® (resina perfluorurata, 5% in alcol alifatico) è stata acquistata dalla Sigma (Milano, Italia). La soluzione tampone fosfato (PBS) è 137 mM in NaCl, 2.7 mM in KCl, 10 mM in Na₂HPO₄, 1.76 mM in KH₂PO₄, 7.5 mM in glucosio, 1.19 mM in CaCl₂ e 0.54 mM in MgCl₂. Per gli esperimenti con KCl 75 mM, è stato utilizzato un PBS modificato in cui la concentrazione di KCl è pari a 75 mM e quella di NaCl è pari a 81 mM. Per gli esperimenti calcium-free è stato preparato un PBS privo di CaCl₂ e al quale è stato aggiunto acido etilenglicoltetraacetico (EGTA) in concentrazione 1 mM. Tutti i PBS hanno un pH di 7.4. Tutti i sali utilizzati sono stati acquistati dalla Sigma (Milano, Italia). La mecamilamina, e la nicotina sono state comprate dalla Sigma (Milano, Italia). La grafite, la resina epossidica e i multiwalled carbonanotubes sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Le soluzioni di DA e 3-MT sono state preparate con acqua Milli-Q ed utilizzate sul momento. Le soluzioni concentrate di DOPAC, HVA e AA sono state preparate in HCl 0.1 mM e conservate in freezer per una settimana prima dell'uso. La soluzione di UA è stata preparata in NaOH 2 mM,

conservata a + 4°C e diluita in acqua Milli-Q prima dell'uso. Il terreno di coltura delle cellule PC12 è costituito da Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)–F12 supplementato con il 10% di siero di cavallo, il 5% di siero fetale bovino e l'1% di antibiotico (streptomicina/penicillina) (Sigma, Milano).

3.2. Materiali e componenti elettronici

Le parti elettroniche sono state acquistate dalla Farnell In One spa (Milano, Italia). La tensione di alimentazione del potenziostato a due canali (*dual channel potentiostat*, DCP) è stata stabilizzata usando regolatori di tensione lineari (LM1086-5 e LM1086-3). La sezione amperometrica del DCP è stata costruita utilizzando sei amplificatori operazionali (National LMC6042), mentre il differenziatore-amplificatore è costituito da due unità AD626 della Analog Devices. I convertitori analogico/digitali (*analog-to-digital converter*, ADC) a 12-bit sono stati costruiti con circuiti integrati della Maxim/Dallas e Analog Devices: MAX1270 (ADC), MAX5156 (*digital-to-analog converter*, DAC), e ADR370 (DAC–VRef). Il microcontrollore multi-core a 32-bit usato nel DCP è un Propeller della Parallax (Parallax, Rocklin, CA, USA). Il convertitore seriale-USB è basato su un controllore FTDI FT232R (Future Technology Devices International, Glasgow, UK).

3.3. DCP (*dual channel potentiostat*): disegno e costruzione

Il DCP è stato costruito sulla base di un modello già sviluppato in precedenza (Hebel e Serra, 2008) ed include due sezioni distinte: una porzione amperometrica e una digitale. La parte analogica (amperometrica a due canali) è stata costruita con un circuito integrato (*integrated circuit*, IC) LMC6042, costituito da due singoli amplificatori operazionali (*operational amplifier*, OPA). La descrizione che segue riguarda un singolo canale analogico. Il DAC (MAX5156), genera il voltaggio necessario per polarizzare il microsensore per la DA (elettrodo di lavoro, *working electrode*, WE) a +250 mV rispetto ad un elettrodo di riferimento in argento/cloruro d'argento (Ag/AgCl, *reference electrode*, RE). Il potenziostato, costituito da un doppio OPA, utilizza come circuito di feedback il RE e l'elettrodo contatore (*auxiliary electrode*, AE). Il convertitore corrente/tensione (I/V) è un adattamento di un classico amplificatore a transimpedenza (Serra et al., 2007) con un guadagno fisso a seconda del valore di R_{f1-2} (nel presente studio pari a 10 M Ω). L'integrato AD626 è un amplificatore differenziale che ha la duplice funzione di rimuovere il potenziale applicato al WE (Rocchitta et al., 2007) ed amplificare il segnale di 100 volte (1 nA/V). Il nucleo centrale della parte digitale è un microcontrollore (*microcontroller unit*, MCU) a calcolo parallelo chiamato Propeller. La MCU ha un indirizzamento a 32 bit ed è stata sviluppata in tecnologia CMOS; è costituita da otto *core* indipendenti chiamati COGs. La MCU lavora a 80 MHz, controlla gli ADC, il DAC, e la trasmissione seriale dei dati al PC.

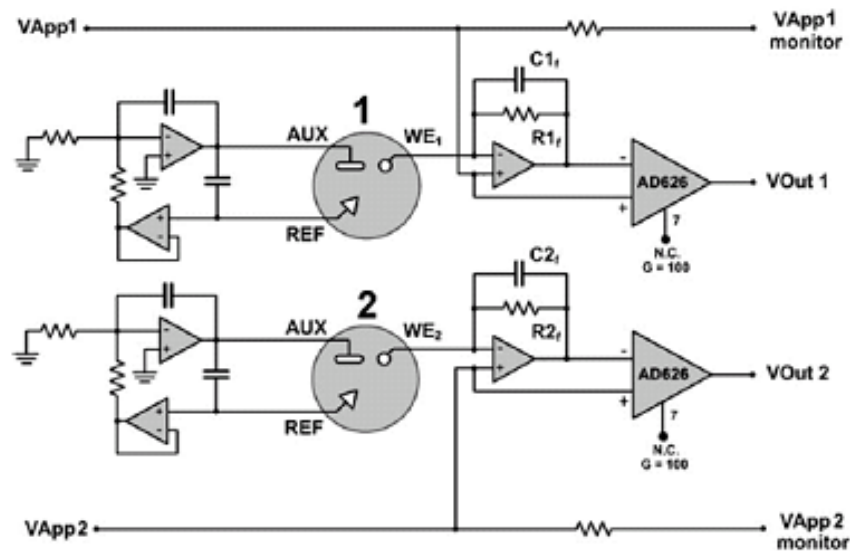


Fig. 6 Rappresentazione schematica del DCP sviluppato e usato in questo studio. Il disegno ha due canali identici che consistono in un potenziostato a due OPA, un convertitore corrente/voltaggio e un differenziatore/amplificatore. Ogni canale controlla una cella elettrochimica completa (1,2) ed è connesso a un outlet del capillare microdialitico. **WE** 1,2, elettrodo di lavoro (sensore per la DA); **REF**, elettrodo di riferimento (**RE**); **AUX**, elettrodo ausiliario; **VApp**1,2, voltaggio applicato (+250 mV vs. **RE**); **Vout** 1,2, voltaggio prodotto.

3.4. Firmware e software

Il firmware del Propeller è sviluppato in Spin, un linguaggio interpretato, trasferito al MCU tramite un circuito di programmazione seriale. Il potenziale applicato al microsensore della DA (+250 mV vs. Ag/AgCl) è generato usando un DAC a due canali controllato da due COGs. La risultante corrente del sensore è convertita a un valore digitale usando due COGs interfacciati ad un ADC multicanale. I restanti COGs sono utilizzati per il processo digitale del segnale (DSP) e generano i dati seriali inviati ad un PC tramite un'interfaccia

USB. Il software di acquisizione dati, completamente modificabile, permette al PC di registrare e visualizzare i dati ricevuti ed è stato sviluppato in Visual Basic NET 2008 utilizzando la libreria grafica ZedGraph.

3.5. Sensore nanostrutturato per la DA

Gli elettrodi di lavoro rivestiti di Nafion[®] sono stati realizzati a partire da fili di argento (Ag) ricoperto di rame (Cu) e rivestiti in Teflon (1.5 mm in lunghezza, Ø = 250 µm, Advent Research Materials, Suffolk, UK). filo di Ag è stato esposto per circa 2 mm rimuovendo lo strato esterno di Teflon ed inserendolo in una microcaps di vetro da microematocrito (microcaps, Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) riempita per 2 mm con la miscela descritte nel paragrafo seguente. Il materiale elettrodico così ottenuto ha un diametro di 500 µm ed un area di 0.196 mm². Dopo aver lasciato reticolare la colla epossidica per 24h a 40°C il materiale ottenuto è stato lucidato utilizzando carta vetrata a 1200 grani e polvere di diamante mentre si è proceduto alla deposizione superficiale di MWCNT nel solo disegno C (Fig. 9). In seguito è stato rivestito per dip-coating con Nafion[®] (immergendolo 3 volte consecutive per pochi secondi nella soluzione alcolica al 5%) e lasciato asciugare per 20' a 120°C. Per la determinazione della DA il WE è stato polarizzato a + 250 mV (vs Ag/AgCl) usando un voltammografo CV37 della (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA) in modalità amperometrica (a potenziale costante). Gli elettrodi per la DA sono stati testati

addizionando volumi noti di una soluzione standard di DA ad una soluzione di PBS, utilizzata come tampone ed elettrolita di supporto. Sono stati utilizzati solo elettrodi in grado di dare sia un responso ben definito *detection limit* per soluzioni di DA a concentrazione pari a 50 nM che di discriminare la DA da AA con un rapporto DA/AA non inferiore a 1000:1. Non si sono registrate parimenti interferenze dovute a risposte elettrochimiche da parte di altri anioni potenzialmente ossidabili (quali UA, DOPAC e HVA) a concentrazioni compatibili con quelle solitamente presenti negli spazi extracellulari della coltura di PC12 ($> 5 \mu\text{M}$).

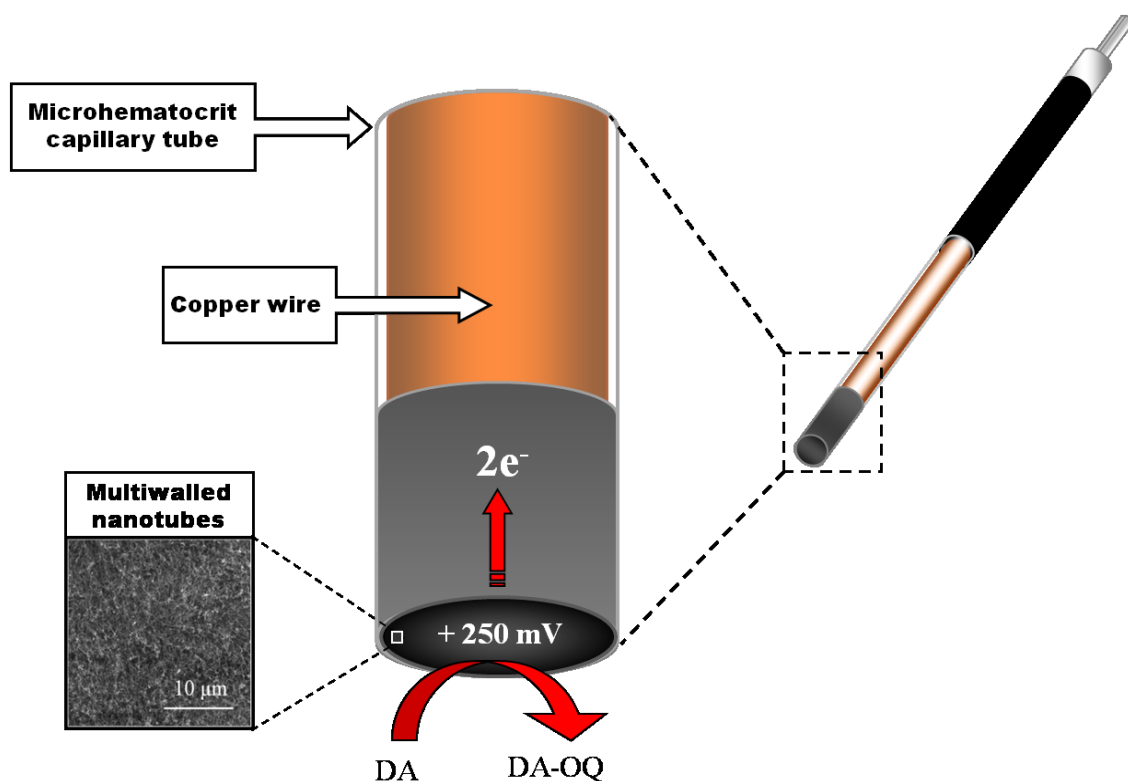


Fig. 7. Disegno schematico dell'elettrodo di lavoro (WE) del sensore per la quantificazione della DA. La reazione di ossidazione della DA nel corrispondente ortochinone (DA-OQ) avviene sul disco di carbonio dell'elettrodo (area di 0.0019 cm², Ø 500 μm) ricoperto di Nafion, applicando un potenziale di + 250 mV.

3.6. Cella elettrochimica sotto flusso (F-TEC)

L'elettrodo di riferimento (RE) ed il contro elettrodo usati nella cella elettrochimica a flusso (F-TEC) sono rispettivamente un filo d'argento rivestito di AgCl e un filo di platino di 2 mm di lunghezza e un diametro di 125 μm. Il RE è stato preparato per anodizzazione per un minuto a + 500 mV vs Ag/AgCl in una soluzione satura di KCl. WE, RE e CE sono stati incollati l'un l'altro con una resina epossidica e saldati ad un connettore PCB da 2.54 mm. La cella F-TEC è stata

assemblata usando una porzione di micropipetta Hamilton da 10 μ l (inlet) e una provetta da microcentrifuga da 250 μ l (Alpha Laboratories, Eastleigh, UK) (outlet). Le due porzioni (*inlet* ed *outlet*) sono connesse a un tubo di polietilene di 25 mm (0.58 mm i.d., Portex, Hythe, UK). Il volume finale della cella F-TEC è approssimativamente di 10 μ l. Per ogni sistema a due canali sono stati selezionati e utilizzati due celle F-TEC con una analoga sensibilità per la DA.

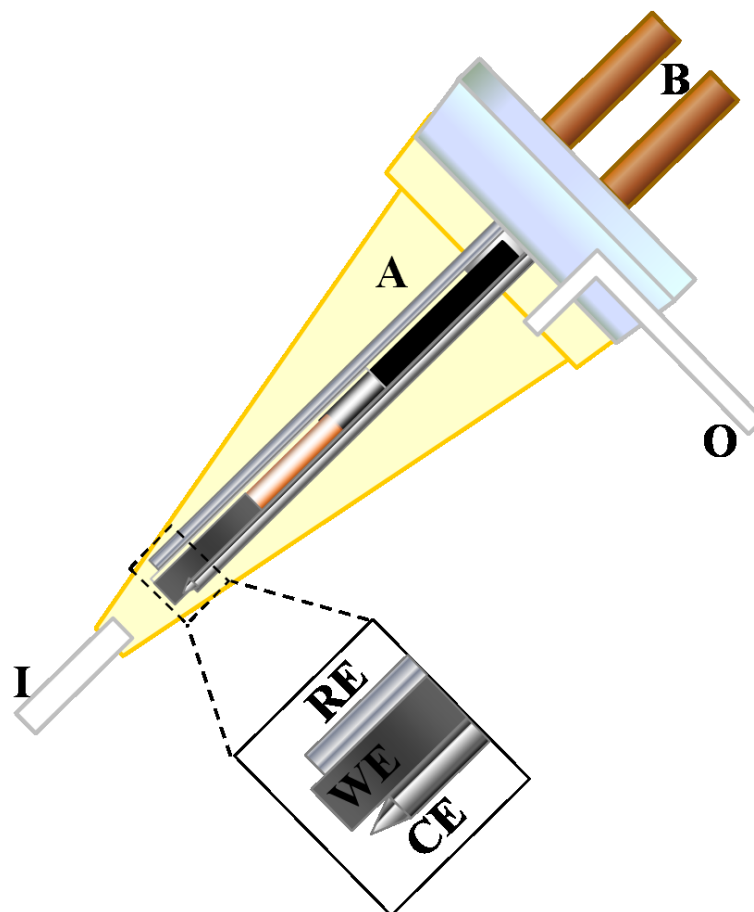


Fig. 8 Disegno schematico della F-TEC sviluppato e usato in questo studio. La cella è composta da una sezione *inlet* (A) e da una sezione *outlet* (B) connessa a un canale del potenziostato. WE, elettrodo di lavoro (microsensore per la DA); RE, elettrodo di riferimento; CE (AUX), elettrodo contatore (ausiliario).

3.7. Sviluppo dei sensori nanostrutturati

Sono stati sviluppati 3 disegni di sensore (Fig. 9) modificando un protocollo già discusso in precedenza (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009).

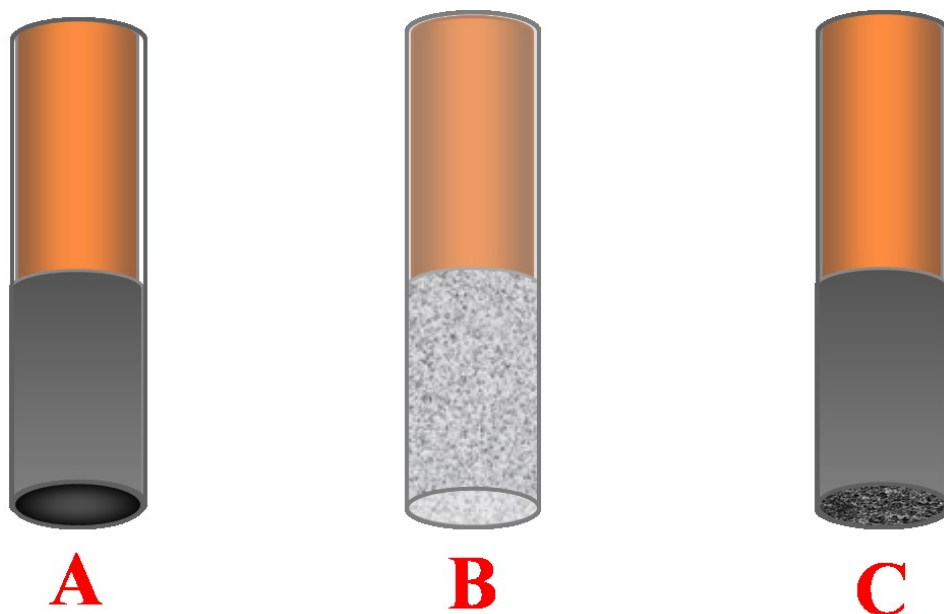


Fig. 9 A: miscela di epoxy-grafite (55% grafite e 45 % resina epossidica); **B:** miscela di epossidica con i MWCNT integrati (18%); **C:** miscela di epoxy-grafite con MWCNT depositati on top

Il supporto di base per tutti i device è costituito da una microcaps di vetro da microematocrito (lunghezza 1.5 cm, volume 5 μ l) all'interno del quale è stato inserito un filo di Cu rivestito di Ag e riempito per 2 mm dall'estremità con una miscela a base di carbonio che costituisce la superficie dell'elettrodo di lavoro.

Le 3 composizioni differenti sono descritte di seguito. Il primo sensore (Fig. 9A) è stato costruito con una miscela composta dal 55% di grafite e dal 45 % di resina epossidica. Il supporto di base caricato con la pasta di epoxy-carbon (grafite) è stato fatto indurire per 24h a 40°C ed il disco costituente la superficie attiva dell'elettrodo di lavoro è stato lucidato prima della deposizione del Nafion e dell'utilizzo. Come si vede dall'immagine al microscopio elettronico a scansione

(SEM) la superficie di lavoro ottenuta risulta liscia, compatta e relativamente omogenea (Fig. 10).

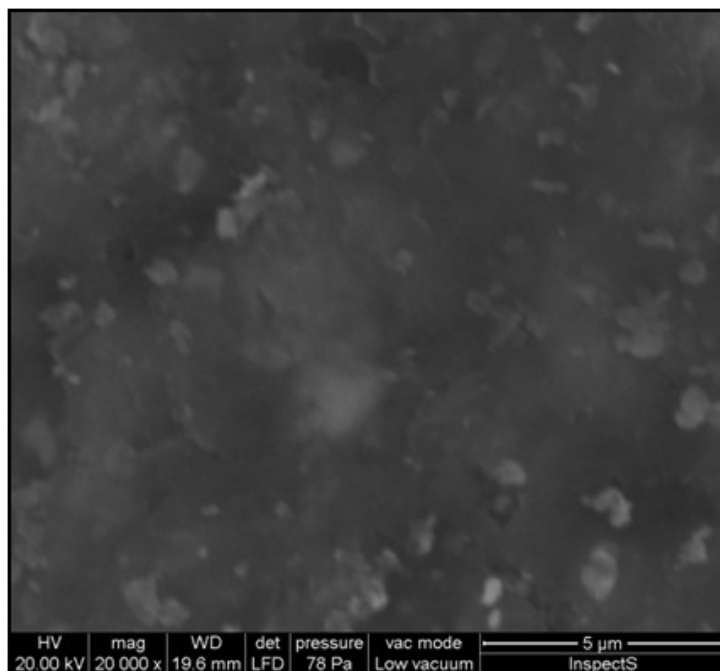


Fig. 10 Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) della superficie del composito resina epoxy-grafite. Da notare la superficie compatta ed omogenea.

Per il secondo sensore (Fig. 9B) è stata utilizzata una miscela composta dal 18 % di MWCNT e dal 82 % di resina epossidica. Il composto così ottenuto è stato caricato nel supporto del sensore, posto in stufa ad asciugare per 24h a 40°C e lucidato prima della deposizione del Nafion e dell'utilizzo. La microscopia elettronica a scansione mostra una superficie omogenea nel contesto della quale sono visibili i MWCNT (Fig. 11).

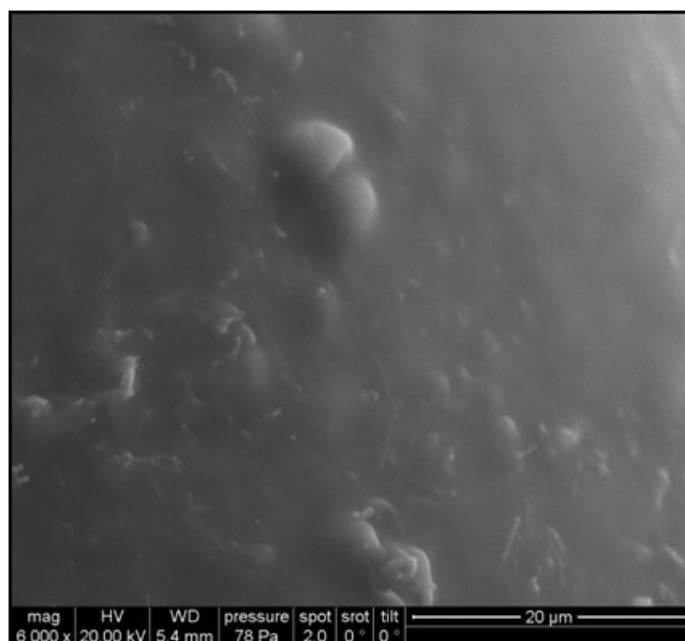


Fig. 11 Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) del composto resina epossidica-MWCNT (18%) che evidenzia i MWCNT in rilievo.

Per il terzo sensore (Fig. 9C) è stata preparata una miscela composta dal 55% di grafite e dal 45 % di resina epossidica sulla quale è stato depositato 1 μl di soluzione acquosa contenente i MWCNT e 5% di PEI. Il disco così ottenuto è stato fatto asciugare per 24h a 40°C e lucidato prima della deposizione del Nafion e dell'utilizzo.

Come si nota dall'immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) (Fig. 12) nel composto di epoxy-carbon ricoperto dalla soluzione MWCNT-polietilenimina (PEI, 5%) i MWCNT creano una superficie meno regolare, ma molto più ampia rispetto ai disegni precedentemente descritti permettendo così di aumentare enormemente la superficie attiva dell'elettrodo di lavoro.

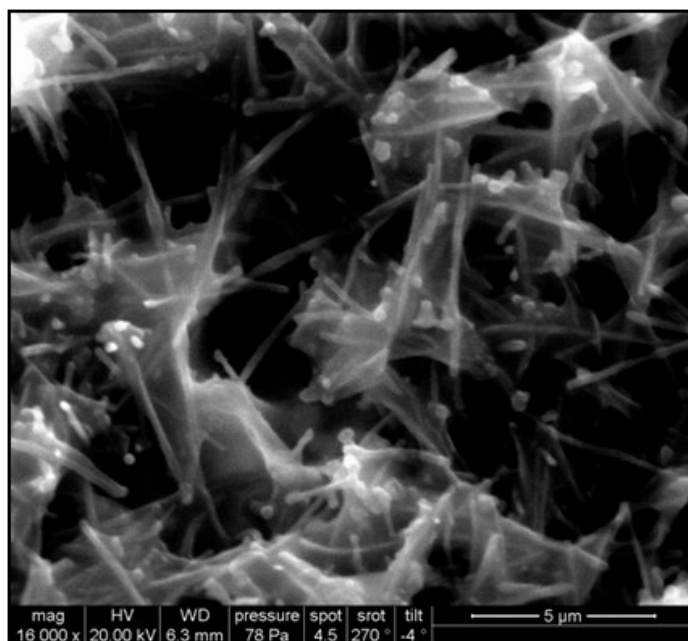


Fig. 12 Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) del composto resina epossidica ricoperta dalla soluzione MWCNT-PEI(5%). Da notare in rilievo i MWCNT inglobati nella PEI.

3.8. Costruzione del tubo capillare per la microdialisi in vitro

Il tubo capillare per la microdialisi delle cellule PC12 è un adattamento di un disegno precedentemente ideato ed utilizzato sperimentalmente (Rocchitta et al., 2005b; Serra et al., 2003a; Serra et al., 2003b). La sonda da microdialisi (Fig. 13 e Fig. 14) è stata costruita usando due porzioni di tubo di silice ricoperto di plastica (150 μm o.d., 75 μm i.d., Scientific Glass Engineering, Milton Keynes, UK), in ognuno dei quali è stata collocata una fibra da dialisi semipermeabile in poliacrilonitrile (AN-69, Hospal Industrie, Meyzieu, France). Ogni fibra da dialisi ha un lunghezza attiva di 40 mm. In seguito, ogni porzione di tubo di silice ricoperto di plastica è

stato posizionato al centro del tubo di polietilene (0.58 mm i.d., 35 mm long, Portex). Queste due sezioni di tubo di polietilene servono da *inlet*. Il dializzato di ogni fibra da dialisi di poliacrilonitrile è riunito dal tubo di polietilene che serve da *outlet*. Altre due porzioni di tubo di silice ricoperto di plastica di 40 mm di lunghezza sono sigillate all'esterno del tubo di polietilene per il caricamento della sospensione delle cellule PC12 in due camere da dialisi differenti. Tutte le parti sono ricoperte con colla epossidica a presa rapida, quindi le sonde da microdialisi (fibre da dialisi in poliacrilonitrile semipermeabile più i tubi saldati di silicone ricoperto di plastica) sono posti in due tubi capillari da microematocrito non eparinizzati (lunghi 7.5 mm, 1.1 mm i.d., Chase Scientific Glass, Rockwood, IL, USA). Il volume finale di ogni camera microdialitica è approssimativamente di 50 μ l. Due *inlet* distinti e due *outlet* permettono raccolte separate del campione dializzato e trattamenti farmacologici separati. Ciò ha permesso di eseguire due esperimenti separati e indipendenti allo stesso tempo usando la stessa sospensione di cellule PC12 di partenza.

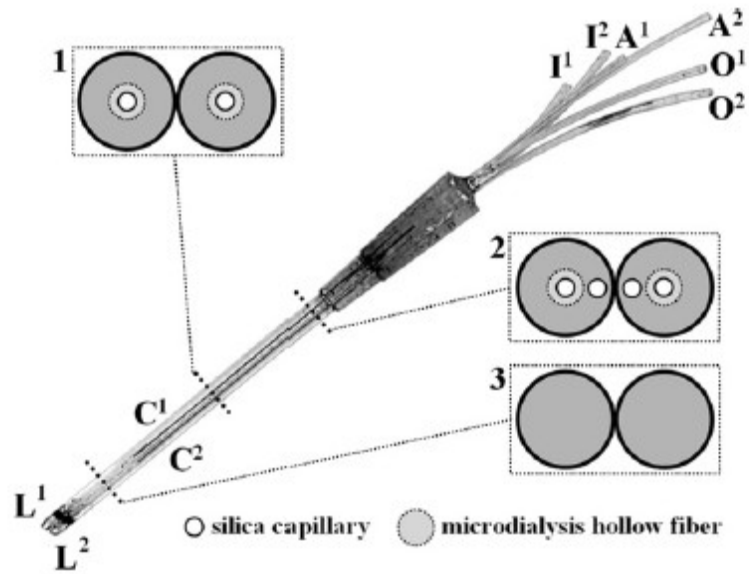


Fig. 13 Disegno schematico di tre sezioni (1-3) del capillare microdialitico a due canali usato in questo studio. $C^{1,2}$, capillari microdialitici; $I^{1,2}$, tubi *inlet*; $O^{1,2}$, tubi *outlet*; $A^{1,2}$, tubi di aspirazione; $L^{1,2}$, estremità per l'aspirazione della sospensione cellulare.

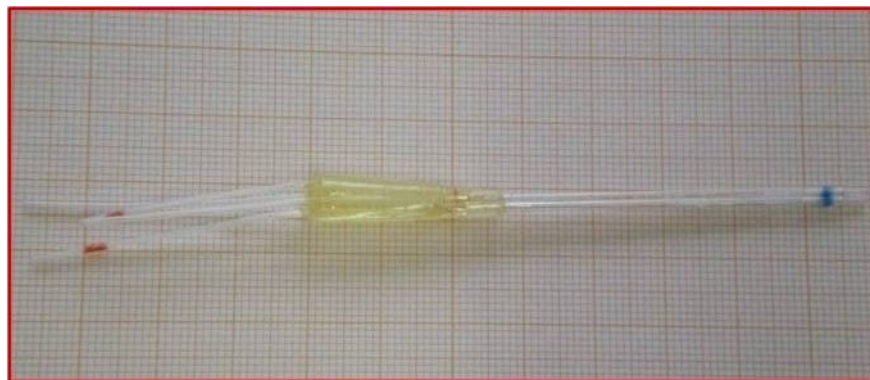


Fig. 14 Fotografia del capillare microdialitico a due canali utilizzato negli esperimenti

3.9. Drug reservoir e fluid mixer

È stato costruito un drug reservoir (DR) contenente 50 μl utilizzando una porzione di pipetta Hamilton da 100 μl e una provetta da microcentrifuga da 250 μl (Alpha Laboratories). Il DR è attraversato da un flusso di perfusione che la connette direttamente al capillare microdialitico, mentre un circuito ausiliario permette un ricambio del contenuto del DR avente funzione di iniettore. Gli *inlet* e gli *outlet* del DR sono costruiti tagliando quattro aghi, tre aventi un diametro esterno di 22 G, e uno avente un diametro esterno di 27 G. Questa tecnica facilita il caricamento del DR con una soluzione contenente il farmaco e assicura un impatto minimo sulla microfluidica del tubo da microdialisi. Il miscelatore di flusso (FM) è stato costruito usando un ago 23 G ed un tubo di silicone ricoperto di plastica da 15 mm. (150 μm , o.d., 75 μm i.d., Scientific Glass Engineering); l'ago è direttamente connesso all'*outlet* del tubo da micro dialisi (Fig.15). Per ogni sistema a due canali sono costruiti due DR e due FM.

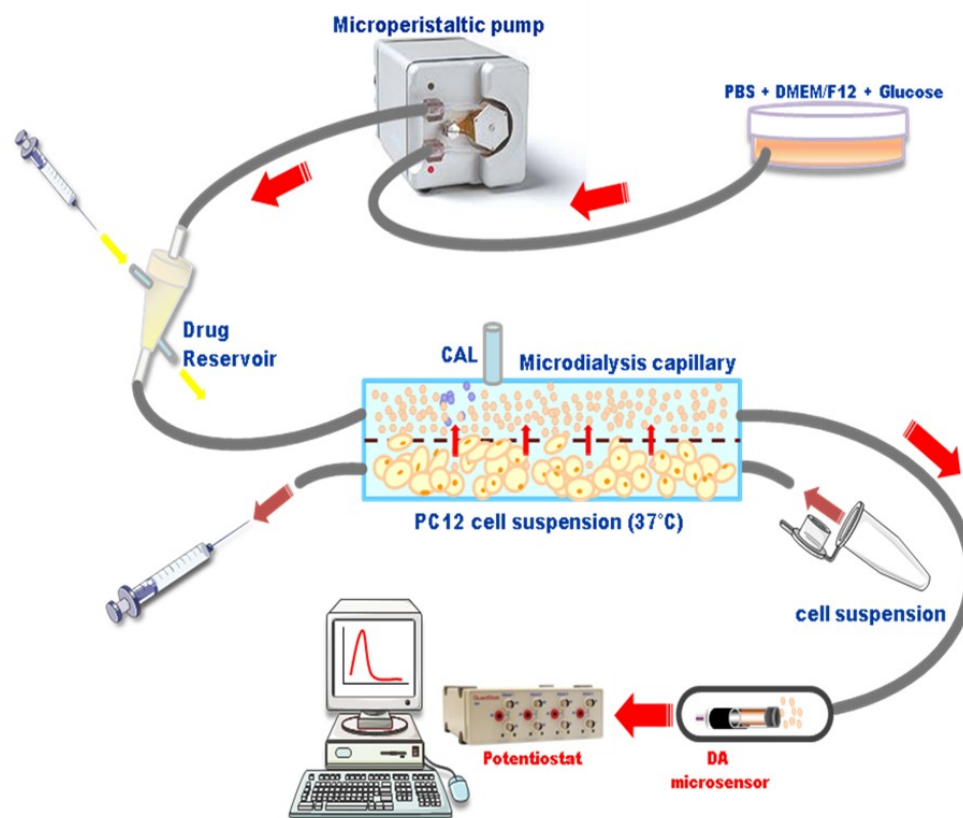


Fig. 15 Schema del singolo canale del sistema microfluidico usato in questo studio. Una micropompa peristaltica eroga una soluzione a base di PBS nel capillare microdialitico attraverso un DR all'interno della quale viene iniettato il farmaco. Le PC12 sono aspirate nella camera microdialitica. Una cella elettrochimica completa, che include il sensore nano strutturato per la DA, è connessa a valle del circuito per il monitoraggio online della DA secreta dalle cellule PC12. La calibrazione diretta del sensore per la DA è effettuato attraverso l'ingresso CAL.

3.10. Solubilizzazione dei carbonanotubi

I carbonanotubi sono allotropi del carbonio dalla struttura cilindrica dell'ordine dei nanometri e vengono costruiti con un rapporto lunghezza/diametro fino a 132,000,000:1 (Wang et al., 2009), significativamente maggiore rispetto a qualsiasi altro materiale. Le loro proprietà innovative e il loro basso costo li rendono utilizzabili in molteplici campi dalle nanotecnologie, alla scienza dei materiali ai possibili utilizzi in campo architettonico. Sono efficienti conduttori termici ma soprattutto possiedono spiccate proprietà elettriche e conduttive. Tali caratteristiche li rendono particolarmente adatti al loro utilizzo quali trasduttori di segnali elettrochimici.

La biocompatibilità dei carbonanotubi e il loro utilizzo nel campo delle neuroscienze sono oramai ampiamente comprovati (Yan et al., 2010; Ciofani et al., 2010). Per la costruzione dei sensori nanostrutturati sono stati utilizzati dei (Multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) del diametro esterno di 15 nm.

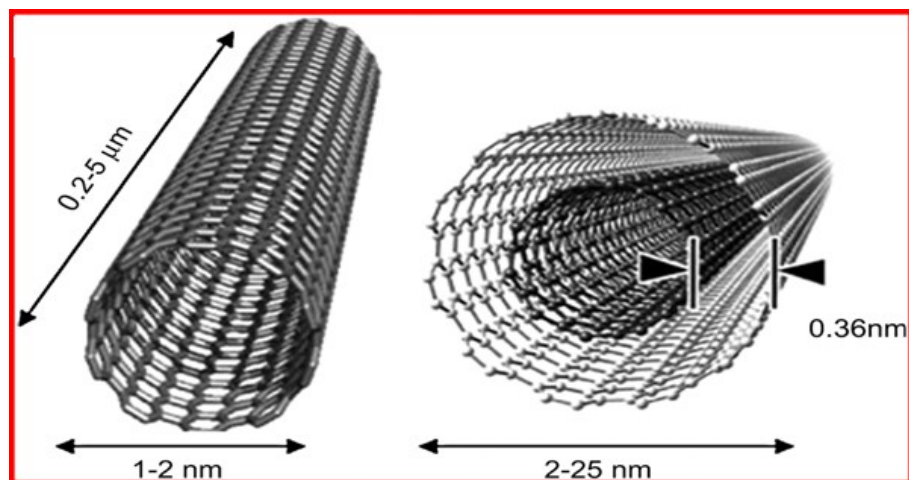


Fig. 16 Rappresentazione schematica di un MWCNT.

Dalla letteratura è noto che i carbonanotubi sono per lo più insolubili e formano facilmente agglomerati in diversi solventi e matrici polimeriche a causa delle numerose interazioni di van der Waals tra queste strutture (Kim et al., 2009). La loro solubilità è limitata ad alcuni solventi organici (Bahr et al., 2009).

E' stato ritenuto necessario solubilizzare i carbonanotubi portandoli in fase acquosa affinché fossero compatibili con i componenti utilizzati nella costruzione dei nanosensori. Questo tentativo di solubilizzazione in matrice acquosa, contenente EtOH al 10%, si è rivelato però inefficace portando alla precipitazione dei MWCNT nella soluzione stessa (Fig. 17). La procedura di solubilizzazione ha richiesto la loro derivatizzazione modificando il metodo di Heli e collaboratori (Heli et al., 2010).

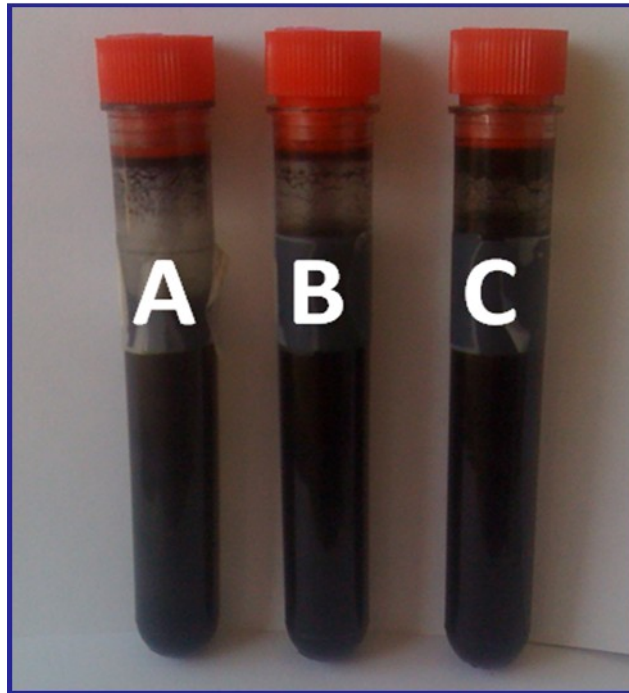


Fig. 17 Solubilizzazione di MWCNT in ambiente acquoso a seguito di un pretrattamento ossidativo. A) MWCNT disciolti in acqua (50 mg/10 ml) e polietilenimmina (PEI) (5%) un giorno dopo la solubilizzazione; B) MWCNT disciolti in acqua (50 mg/10 ml) e PEI (10%) una settimana dopo la solubilizzazione; B) MWCNT disciolti in acqua (50 mg/10 ml) e PEI (5%) tre mesi dopo la solubilizzazione; come è ben visibile dalle figure i nanotubi si presentano costantemente in soluzione e non tendono a formare aggregati ed a precipitare.

Brevemente 50 mg di polvere di MWCNT è stata dispersa in un eccesso di HNO_3 6.0 M. La soluzione è stata preventivamente sonicata per qualche minuto allo scopo di favorire la loro dispersione nel solvente, e poi lasciata per 12h a temperatura ambiente per allontanare i residui dei processi di catalisi necessari alla produzione dei MWCNT. Successivamente si è proceduto al lavaggio con acqua bidistillata e all'asciugatura all'aria. I MWCNT pretrattati sono stati lasciati a refluxo per 6h in una soluzione di acido solforico e acido

nitrico (rapporto di 3:1) (Fig. 17) e di seguito lavati per centrifugazione con acqua bidistillata fino alla neutralizzazione.

Tali procedure di derivatizzazione sono state necessarie per funzionalizzare la superficie con gruppi polari ($-\text{COOH}$ e $-\text{OH}$) portando così all'aumento dell'idrofilicità dei nano tubi (Fig. 18).

In seguito alla derivatizzazione, la polvere modificata di MWCNT è stata lasciata a 40°C per 48h per favorire la disidratazione.

La solubilizzazione di tale polvere ha portato ad una soluzione stabile per poche ore. I tentativi di solubilizzazione sono illustrati nella legenda della figura 17 e prevedono alcuni dei passaggi che verranno applicati nella fase preparativa finale a seguito di un pretrattamento ossidativo.

Nel tentativo seguente alla soluzione acquosa è stata aggiunta polietilenimina (PEI) in percentuale pari al 5% contenente i nanotubi derivatizzati; questa è una resina policationica in grado di interagire con i carbonanotubi attraverso forze intermolecolari (Kong et al., 2010; Star et al., 2003, Mamedov et al., 2002), senza alterarne le proprietà elettrocatalitiche e producendo un significativo aumento della superficie attiva (Rubianesa et al., 2007). I MWCNT derivatizzati assumono cariche negative sulla loro superficie perciò l'interazione con la PEI determinerebbe una separazione dei singoli nanotubi e ne impedirebbe, per via di una repulsione di natura elettrostatica, l'ulteriore aggregazione con conseguente precipitazione. La soluzione così ottenuta si è dimostrata stabile per oltre sei mesi.

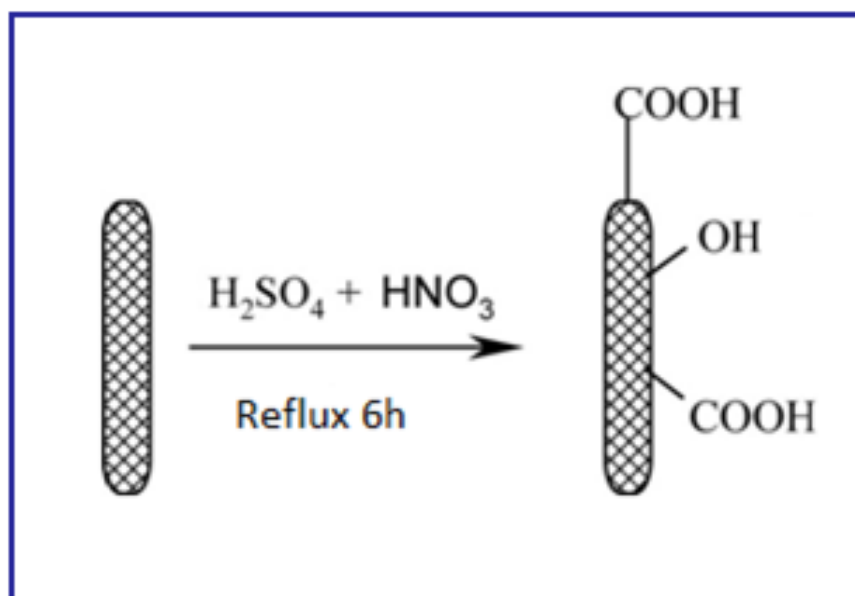


Fig. 18 Derivatizzazione dei MWCNT per aumentare l'idrofilicità mediante gruppi polari ($-\text{COOH}$ e $-\text{OH}$) attraverso dispersione in HNO_3 6.0 M, reflusso per 6h con H_2SO_4 e HNO_3 (3:1) e successivo lavaggio con acqua bidistillata per neutralizzazione.

3.11. Coltura cellulare

Le cellule PC12 sono mantenute a 37°C in piastre di plastica per colture da 60 mm (Migheli et al., 1999). Le colture vengono utilizzate in un intervallo di passaggi compreso tra il 15° e il 20° (Yuyama et al., 2001) La sospensione cellulare utilizzata per gli esperimenti viene preparata nel seguente modo: una volta eliminato il medium di coltura si effettuano due lavaggi con 5 ml di PBS modificato con l'aggiunta di Ca^{2+} (1.2 mM), Mg^{2+} (0.54 mM), glucosio (7.5 mM) e DMEM-F12 (10%); le cellule vengono staccate dal fondo della piastra e separate meccanicamente con una pipetta Pasteur a punta ristretta fino a renderle cellule singole. Una piccola aliquota della sospensione cellulare così ottenuta viene prelevata per effettuare la conta cellulare tramite la camera di Burker e il Trypan Blue (colorante per il saggio

della vitalità cellulare). La sospensione cellulare viene quindi centrifugata a 94 g per 5' e il volume iniziale viene aggiustato in maniera tale da avere una concentrazione finale di cellule compresa tra 2.5×10^5 e $1.5 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$.

3.12. Procedura sperimentale

Dopo che il sistema sperimentale viene assemblato, la corrente viene registrata fino ad ottenere una linea di base stabile. La calibrazione del microsensore per la DA viene eseguita sia prima che dopo ogni esperimento usando l'accesso CAL. Il tubo per la microdialisi cellulare è costantemente perfuso con PBS-DMEM per mezzo di una pompa peristaltica a microinfusione a doppio canale (P720 peristaltic pump, Instech, Plymouth Meeting, PA, USA) con una velocità di flusso pari a $3\mu\text{l}/\text{min}$. I canali della pompa sono connessi agli *inlet* tramite un lungo tubo di polietilene. Ognuna delle due camere microdialitiche (C1 e C2 nella figura 13) viene quindi caricata con $50 \mu\text{l}$ di sospensione di cellule PC12, che viene aspirata tramite due siringhe da 1 ml connesse ai tubi di silicone ricoperti di plastica saldati esternamente con i tubi di polietilene. Quindi il sistema perfuso viene mantenuto a una temperatura di 37°C e la corrente della DA viene registrata per la durata intera dell'esperimento. Il DR viene poi riempito con KCl 75 mM o nicotina 1mM dopo 120' dal caricamento delle cellule.

3.13. Analisi cromatografica del microdializzato ottenuto dalla sospensione di cellule PC12

La quantificazione della DA nel dializzato ottenuto dall'esperimento scelto 1.5×10^6 cellule viene effettuata tramite cromatografia HPLC-EC (Rocchitta et al., 2005b; Serra et al., 2003a; Serra et al., 2005b; Migheli et al., 1999). Il sistema cromatografico utilizzato consta di una pompa Alltech 426 HPLC (Alltech, Sedriano, Italia), una valvola di iniezione Rheodyne (modello 7725, Rohnert Park, CA, USA), una fase stazionaria C18 (15 cm x 4.6 mm i.d., ODS80TM, Toso Haas, Stuttgart, Germania), un detector elettrochimico ANTEC–Leyden EC controller (ANTEC, Zoeterwoude, The Netherlands), e un PC-based ADC system (Varian Star Chromatographic Workstation, Varian, Walnut Creek, CA, USA). La fase mobile è una soluzione acquosa 0.1 M in acido citrico, 1.0 mM in acido etilendiaminotetraacetico (EDTA), 8.7% in MeOH e contenente 48mg/L di sodio octilsolfato. La velocità di flusso è pari a 1.2 ml/ min ed il pH operativo è pari a 2.9.

3.14. Saggio di vitalità cellulare

Il saggio di vitalità cellulare con Trypan Blue viene effettuato due volte nella stessa sospensione cellulare: prima di riempire il sistema capillare, ed alla fine di ogni esperimento, cioè 6h dopo il caricamento delle cellule nel tubo microdialitico. Per ogni esperimento il tasso di vitalità è dato dalla differenza tra la percentuale finale e iniziale delle

cellule non vitali e la differenza tra le cellule non vitali in ogni camera microdialitica.

3.15. Analisi statistica

La corrente di ossidazione della DA è espressa in picoampere (pA) ed è data dalla media \pm errore standard della media, mentre la concentrazione della DA è espressa in micromoli (μM). Dopo le calibrazioni del microsensore per la DA la linea di regressione è calcolata tra la corrente di ossidazione e le concentrazioni di DA iniettata.

4. RISULTATI

4.1. Caratterizzazione statica dei differenti disegni di sensore per la DA

I nuovi sensori per la DA sono stati calibrati *in vitro* per sette giorni consecutivi. Per la calibrazione è stato utilizzato un beaker di Teflon da 25 ml modificato come descritto in precedenza (Serra et al., 2007). I sensori sono stati immersi nel beaker contenente PBS ed è stato applicato un potenziale costante di +250 mV. Il sistema di calibrazione è stato posizionato su un agitatore magnetico fino al ottenimento di una linea di base stabile. Per miscelare la soluzione di PBS, dopo ogni aggiunta di quantità nota di DA, è stata utilizzata un'ancoretta magnetica di 32 mm di lunghezza; la corrente risultante dall'ossidazione è stata registrata in condizioni di quiescenza (dopo aver agitato la soluzione). Le calibrazioni dei sensori così ottenute hanno mostrato differenze di sensibilità. Il sensore costituito da epoxy-grafite, la cui retta di regressione è rappresentata nella figura 19, ha una sensibilità pari a $0,766 \pm 0,11 \text{ nA} \times \mu\text{M}^{-1}$ con un R^2 corrispondente a 0,989.

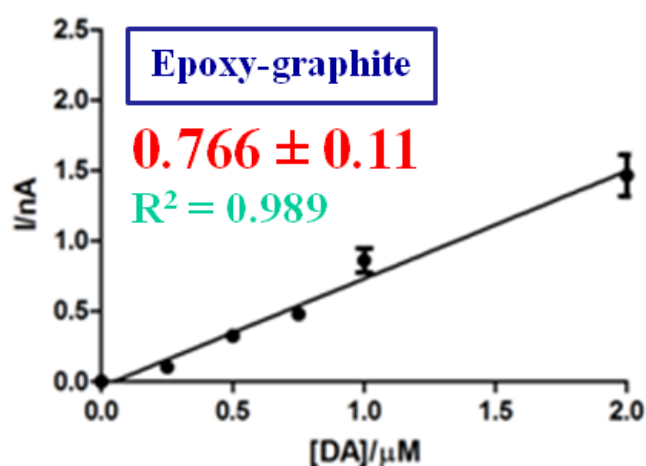


Fig. 19 Retta di regressione di un sensore costituito da epoxy-grafite.

Come mostra la figura 20, l'aggiunta di MWCNT (18%) alla miscela di epoxy ha portato a una diminuzione della sensibilità ($0,257 \pm 0,06 \text{ nA} \times \mu\text{M}^{-1}$ con un R^2 di 0,992; $n=4$) di 3 volte rispetto al device costituito solo da epoxy-grafite.

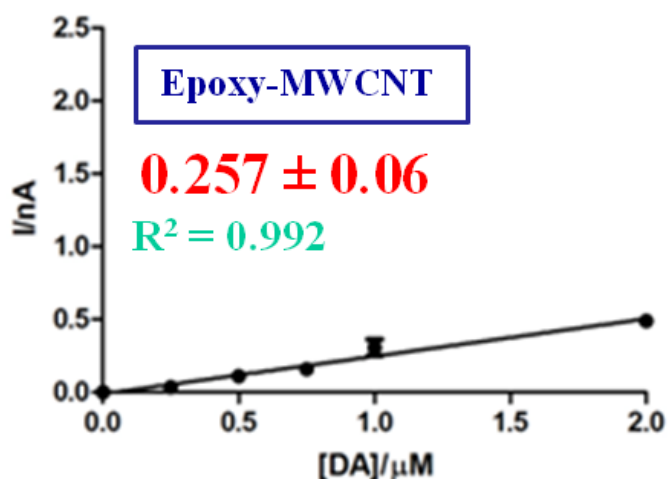


Fig. 20 Retta di regressione di un microsensore a disco costituito da epoxy-MWCNT.

Addizionando la miscela di MWCNT sulla superficie di epoxy-grafite abbiamo invece ottenuto una sensibilità maggiore rispetto ai due dispositivi descritti in precedenza ($3,533 \pm 0,19 \text{ nA} \times \mu\text{M}^{-1}$ con un R^2 di 0,997; $n=4$). Come mostrato nella retta di regressione della figura 21, la sensibilità è aumentata di circa 5 volte rispetto al device costituito da epoxy-grafite.

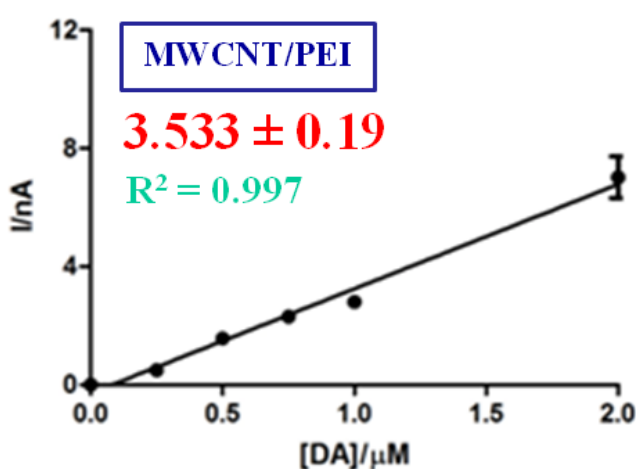


Fig. 21 Retta di regressione di un microsensore a disco costituito da MWCNT/PEI on top.

Nella tabella che segue sono mostrati in sintesi i risultati ottenuti dalle calibrazioni delle diverse tipologie di sensori nanostrutturati.

SENSORE	SLOPE ($\text{nA} \times \mu\text{M}^{-1}$)	R^2
mix epoxy-grafite (45:55)	$0,766 \pm 0,11$	0,989
mix epoxy-MWCNT (82:18)	$0,257 \pm 0,06$	0,992
mix epoxy-grafite (45:55)/ MWCNT-PEI (10%) on top	$3,533 \pm 0,19$	0,997

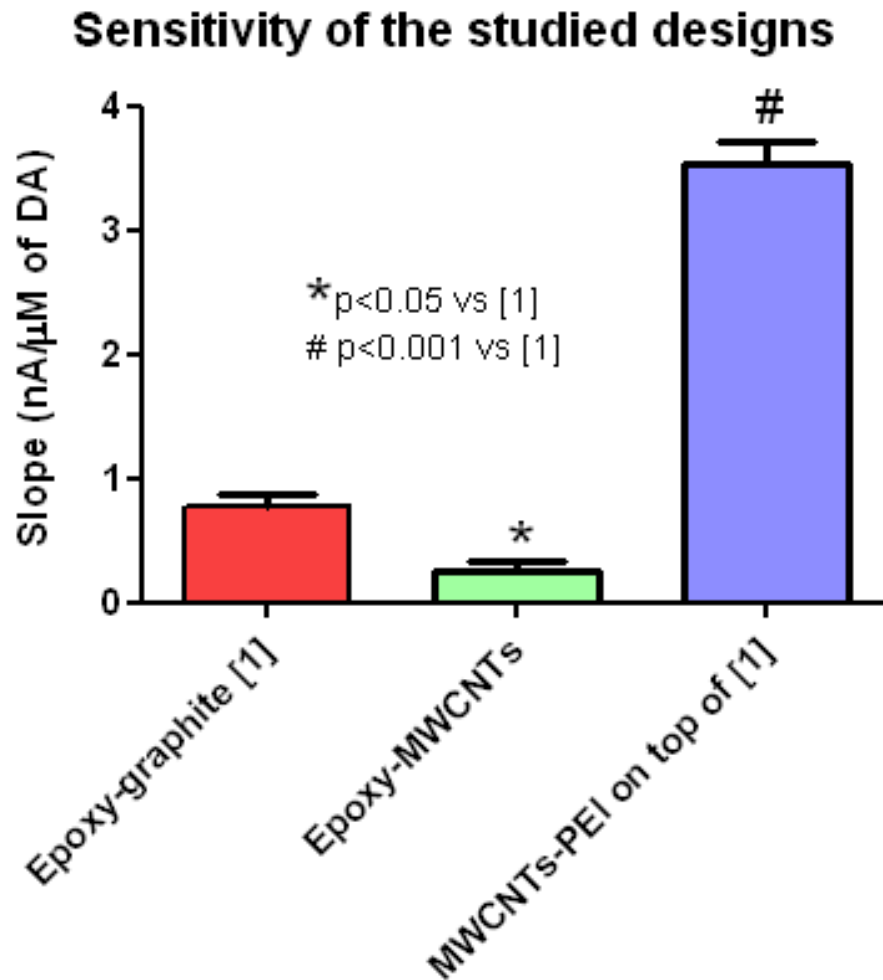


Fig. 22 Sensibilità dei tre disegni del sensore nanostrutturato per la DA.

Il sensore che ha mostrato una maggiore sensibilità (Fig. 22) alla calibrazioni statiche è stato selezionato ed integrato nel sistema microdialitico per le successive calibrazioni dinamiche e per la lettura della DA secreta da parte delle cellule PC12.

4.2. Caratterizzazione statica e dinamica della cella elettrochimica contenente il sensore nano strutturato per la DA

Tutte le calibrazioni *in vitro* del sensore nano strutturato per la DA sono state effettuate a 37°C e dopo 24h dalla sua incorporazione nella della cella elettrochimica (F-TEC) e sono state ripetute per sette giorni consecutivi. La risposta del sistema alla DA è stata testata in condizioni quiescenti connettendo ogni canale del DCP all'*outlet* della F-TEC comprendente un microsensore per la DA, un contro elettrodo ed un elettrodo di riferimento. Per la calibrazione è stato utilizzato un beaker di Teflon da 25 ml modificato come descritto in precedenza (Serra et al., 2007). Prima di procedere alla calibrazione, la F-TEC è stata immersa in un beaker contenente PBS ed è stato applicato un potenziale costante di + 250 mV. Il sistema di calibrazione è stato posizionato su un agitatore magnetico fino al raggiungimento di una linea di base stabile. Per miscelare la soluzione di PBS, dopo ogni aggiunta di quantità nota di DA, è stato utilizzata un'ancoretta magnetica di 32 mm di lunghezza; la corrente risultante dall'ossidazione è stata registrata in condizioni di quiescenza (dopo aver agitato la soluzione). La calibrazione del microsensore della DA così ottenuta ha evidenziato un'eccellente linearità con una pendenza di $3.287 \pm 0.25 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.998$, $n = 3$). Dopo 6 giorni la sensibilità del microsensore decresce a $2.256 \pm 0.58 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ mantenendo comunque una buona linearità ($r^2 = 0.989$, $n = 6$).

La calibrazione dinamica del microsensore della DA (Fig. 23) è stata effettuata sotto flusso stabile (3 $\mu\text{l}/\text{min}$) connettendo la pompa

peristaltica e la pompa da microiniezione al miscelatore di flusso. La retta di regressione è stata calcolata sulla base delle correnti di picco registrate dopo ogni iniezione di DA, ottenendo sensibilità di $4.01 \pm 0.1 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.995$, $n = 3$). Per una descrizione dettagliata della calibrazione dinamica della DA si faccia riferimento alla figura 27.

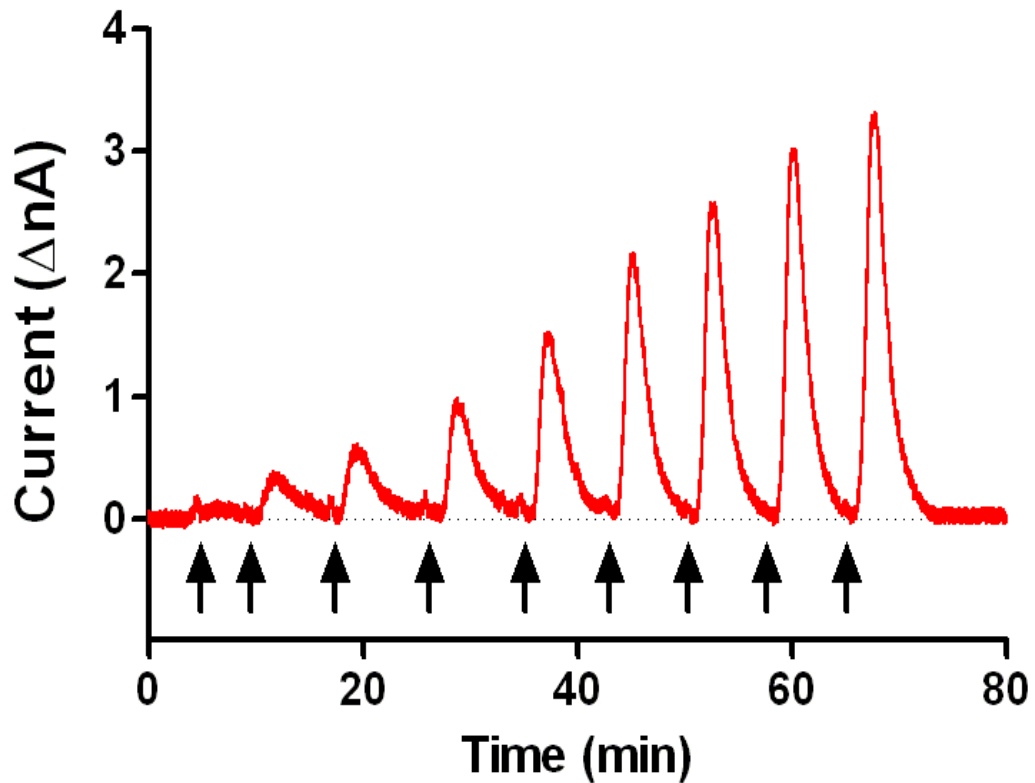


Fig. 23 Calibrazione dinamica del sensore nano strutturato.

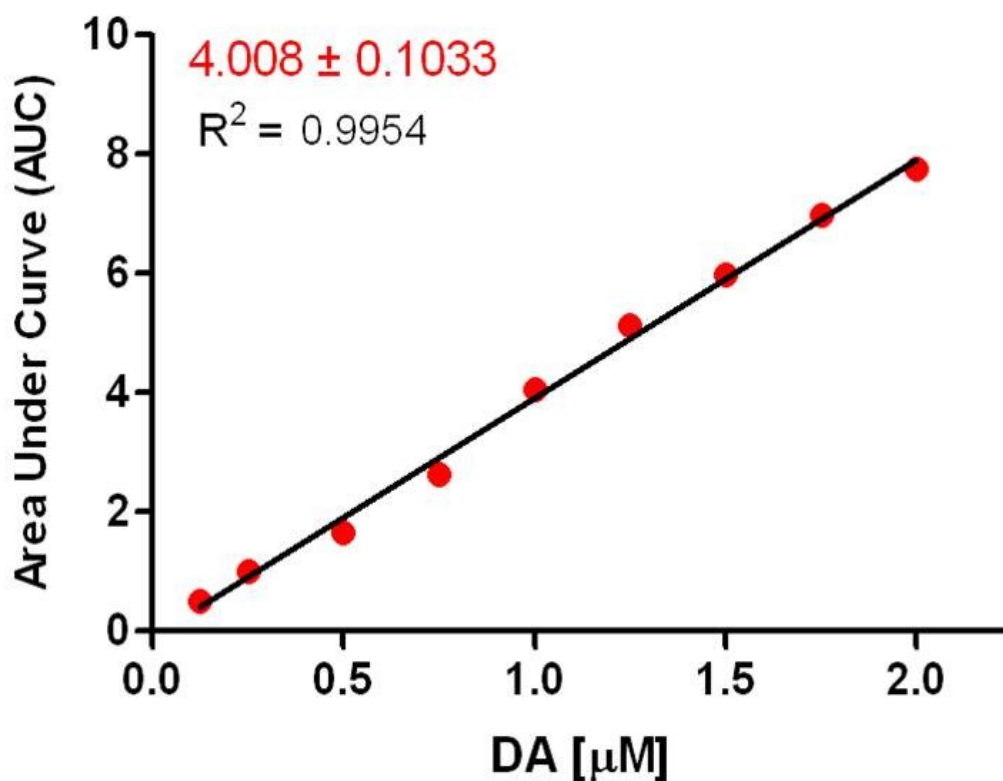


Fig. 24 Area sotto la curva (AUC), calibrazione dinamica del sensore nano strutturato

4.2. Effetti di concentrazioni crescenti di DA in camera microdialitica e del flusso di perfusione sulle correnti di DA

In una prima sequenza di esperimenti effettuati a distanza di un giorno dalla costruzione della F-TEC, aliquote di una soluzione di PBS, ciascuna caratterizzata da una diversa concentrazioni di DA, sono state caricata nella camera microdialitica simulando un'aspirazione di cellule PC12. Le concentrazione di analita testate sono state: 250 nM, 500 nM, 1000 nM (Fig. 25). La retta di regressione è stata valutata sulla base dell'altezza del picco della DA e la sensibilità ottenuta è pari a $3.97 \pm 0.16 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.996$, $n = 3$). Una seconda serie di

esperimenti ha permesso di ottimizzare il flusso di perfusione. Sono stati eseguiti tre caricamenti della camera microdialitica con una soluzione di PBS contenente una soluzione di DA 250 nM e utilizzando tre differenti flussi di perfusione: 6 $\mu\text{l}/\text{min}$, 3 $\mu\text{l}/\text{min}$, e 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Fig. 26). La modifica del flusso di perfusione è stata effettuata prima di ogni aspirazione di DA e ciò ha determinato variazione sul valore della corrente di picco di DA. È stata quindi calcolata la retta di regressione e la sensibilità per la DA è diminuita di $23 \pm 0,04 \text{ nA}$ ($r^2 = 0.966$, $n = 3$) per ogni $\mu\text{l}/\text{min}$ di incremento del flusso di perfusione. Sulla base delle evidenze sperimentali attuali e di quelle pregresse (quantificazione elettrochimica della DA in F-TEC, Migheli et al., 2008) è stato valutato un flusso ottimale di 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ per la realizzazione degli esperimenti con le cellule PC12.

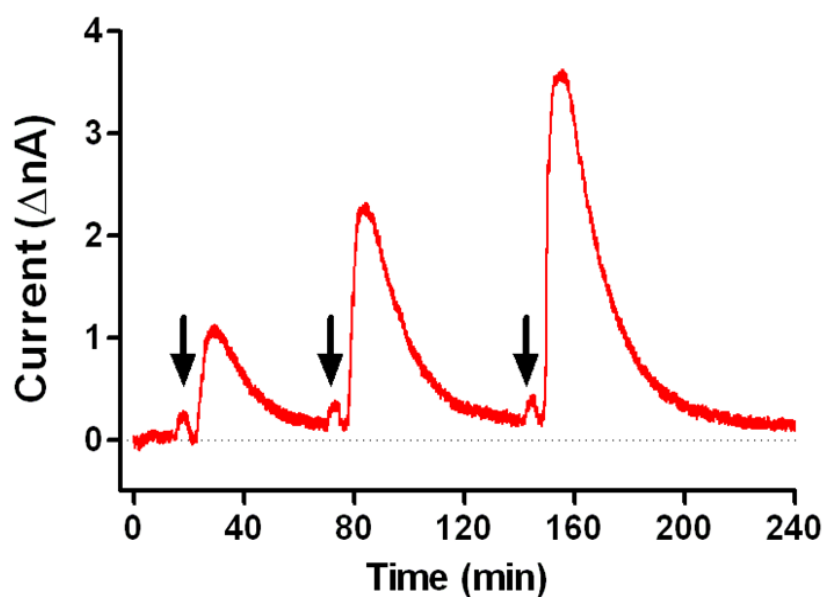


Fig. 25 Corrente di DA dopo una serie di tre caricamenti consecutivi di una soluzione di PBS contenente differenti concentrazioni di DA (250, 500, e 1000 nM) ad un flusso di perfusione di (3 $\mu\text{l}/\text{min}$). L'aspirazione nel capillare microdialitico viene eseguita come descritto per il caricamento delle cellule PC12 (vedi testo) usando una siringa Hamilton da 1 ml.

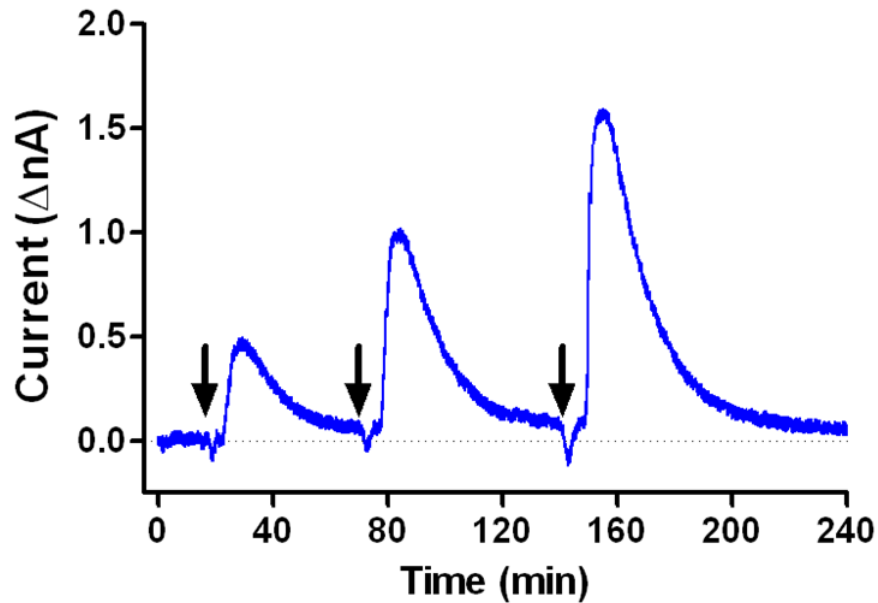


Fig. 26 Corrente di DA registrata dopo un caricamento di PBS contenente una concentrazione fissa di DA (250 nM) a differenti flussi di perfusione (6, 3, e 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$). L'aspirazione nel capillare microdialitico è fatta come descritto per il caricamento delle cellule PC12 (vedi testo) usando una siringa Hamilton da 1 ml.

4.3. Effetto del numero delle PC12 sul rilascio di DA

Dopo tre caricamenti di DA e la relativa valutazione statistica dei dati, la camera microdialitica è stata lavata con acqua bidistillata e le PC12 sono state caricate mediante aspirazione nel capillare microdialitico come già descritto nella sezione materiali e metodi. Sono stati condotti diversi esperimenti effettuando caricamenti di concentrazioni crescenti di PC12 varianti da 2.5×10^5 a 1.5×10^6 cellule. Un picco di DA (Fig. 27) è comparso dopo circa 7 min dal caricamento con una concentrazione (ΔC_L) calcolata proporzionale al numero di cellule presenti nella sospensione cellulare. Il ΔC_L è stato graficamente determinato dopo ogni esperimento come funzione delle concentrazione di DA secreta rispetto al numero di cellule PC12 (Fig.

27). Anche in questo caso è stata ottenuta una retta di regressione in cui ogni punto corrispondeva alla quantità di DA secreta da un numero di cellule predefinito. Dall'analisi della regressione lineare è risultato un contributo di secrezione pari a 0.812 ± 0.054 pMoli/L di DA da parte di ogni singola cellula PC12 caricata nella camera microdialitica in accordo con precedenti osservazioni (Migheli et al., 2008). Non sono state evidenziate differenze nella ΔC_L in presenza o assenza di Ca^{2+} , mecamilamina o nicotina nel liquido di perfusione. L'analisi cromatografica del dializzato ha inoltre evidenziato una concentrazione massima iniziale di DA pari a 1.205 ± 0.044 $\mu M / 1.5 \times 10^6$ cellule e 0.124 ± 0.036 $\mu M / 1.5 \times 10^6$ cellule 120 min dopo il caricamento, confermando i risultati già ottenuti usando la microdialisi *in vitro* (Serra et al., 2003a; Migheli et al., 2008).

4.4. Effetto del KCl sulla secrezione di DA in presenza o meno di Ca^{2+} extracellulare

Il sistema microdialitico è stato perfuso in entrambi i canali (canale 1 e canale 2) con un PBS modificato con 10% di medium sia in presenza che in assenza di $CaCl_2$. Il KCl (75 mM) è stato iniettato in entrambe le DR 90 min dopo il caricamento delle cellule. Un picco di secrezione di DA (definito come ΔC_{KCl}) è comparso dopo circa 8 min dall'iniezione di KCl, ma solo in presenza di Ca^{2+} extracellulare (Fig. 27). Questo picco è risultato essere proporzionale al numero di cellule, al KCl iniettato e al $CaCl_2$ extracellulare. L'analisi del dializzato con l'HPLC ha confermato un incremento massimo della concentrazione di DA di 1.325 ± 0.073 $\mu M / 1.5 \times 10^6$ cellule 40 min dopo l'iniezione

di KCl, e tale dato è compatibile con i risultati precedentemente pubblicati (Serra et al., 2003a; Migheli et al., 2008).

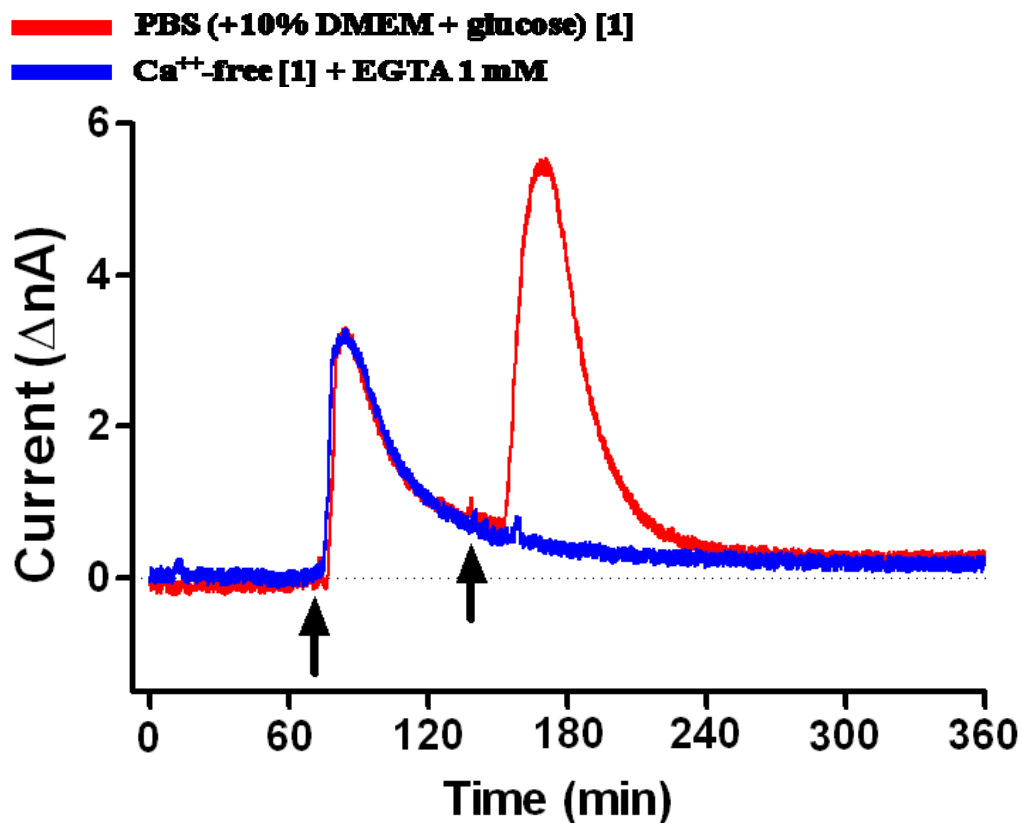


Fig. 27 Variazioni di DA per 1.5×10^6 PC12 cellule caricate (ΔC_L , 1) e iniezione di KCl (75 mM) (ΔC_{KCl} , 2) registrate simultaneamente con fluido di perfusione normale e Ca²⁺-free (rispettivamente curva rossa e curva blu).

4.5 Effetto della nicotina sul rilascio di DA in presenza di mecamilamina

In una prima serie di esperimenti trattato-controllo il sistema microdialitico è stato perfuso in entrambi i canali con un PBS modificato con 10% di medium. Circa 90 min dopo il caricamento delle cellule, attraverso la DR sono state iniettate in un canale del sistema microdialitico concentrazioni crescenti di nicotina (da 0.125 mM a 1 mM) (Fig. 28). Un picco di secrezione di DA (definito come $\Delta C_{\text{Nicotine}}$) è apparso dopo circa 20 min dall'iniezione di Nicotina, ed è risultato essere proporzionale alla concentrazione della nicotina iniettata nella DR.

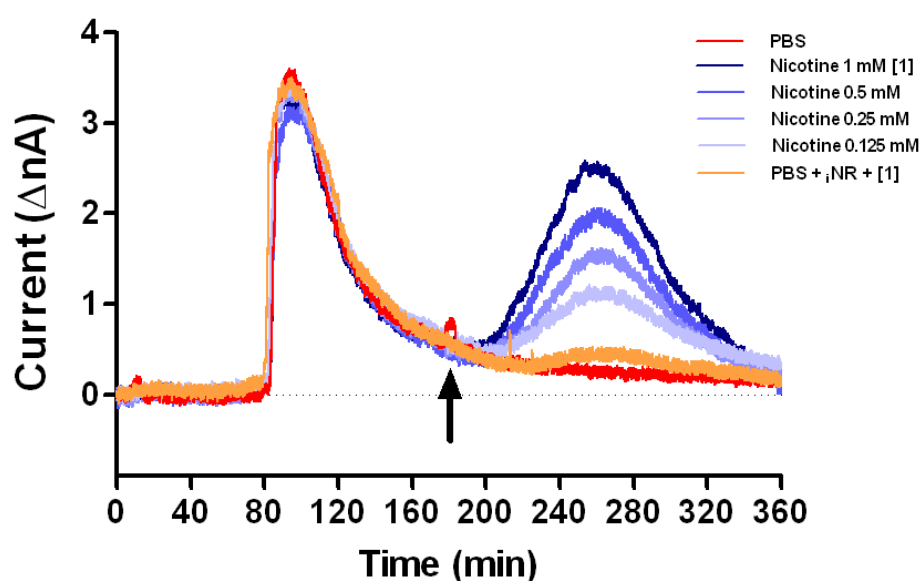


Fig. 28 Variazioni di DA per 1.5×10^6 PC12 cellule caricate (ΔC_L) e iniezione di Nicotina (0.125 mM-1mM) ($\Delta C_{\text{Nicotine}}$) registrate simultaneamente con fluido di perfusione normale e iNR = Inibitore del recettore per la Nicotina (mecamilamina 10 μM).

In una seconda serie di esperimenti il sistema microdialitico è stato perfuso con due soluzioni di PBS a differente composizione: il canale 1 con un PBS modificato con 10% di medium e il canale 2 con un PBS modificato con 10% di medium e con l'aggiunta di mecamilamina 10 μM (un inibitore del recettore per la Nicotina, iNR). Per ogni esperimento condotto è stata iniettata in entrambi, i canali del circuito (utilizzando i DR), una singola dose di nicotina 90 min dopo il caricamento delle cellule. Il range di concentrazioni di nicotina variava da 0.125 mM a 1 mM. Un picco di secrezione di DA (definito come $\Delta C_{\text{Nicotine}}$) è apparso dopo circa 20 min dall'iniezione di nicotina solo nel canale privo di iNR (Fig. 29). Detto picco è risultato essere proporzionale alla quantità di nicotina iniettata.

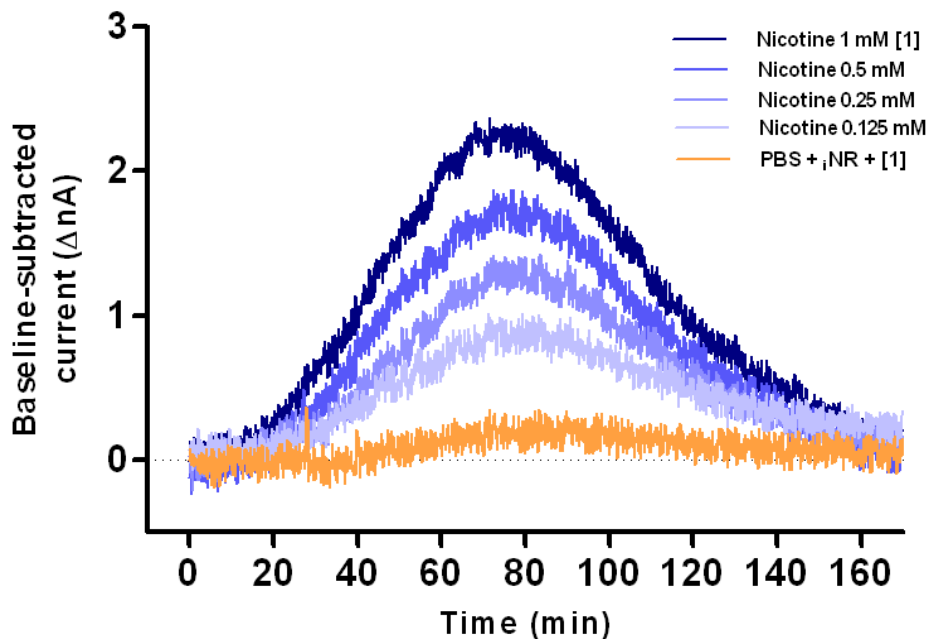


Fig. 29 La linea di base è stato sottratto dalle curve ottenute dopo somministrazione di nicotina (partendo da 180 min). L'area sotto la curva (AUC) di DA corrente è stata calcolato (come l'integrazione delle correnti differenziali) per ogni concentrazione di nicotina.

Dopo la sottrazione della linea di base e la successiva integrazione dell'area sotto la curva di DA (AUC), la quantità di DA secreta (così ottenuta dall'integrazione delle correnti differenziali) è stata plottata verso la quantità di nicotina utilizzata per indurne la secrezione.

Come si nota dalla curva rappresentata in figura 30, la relazione intercorrente tra la nicotina e la DA è di tipo iperbolico ($R^2 = 0,998$) e rappresenta un fenomeno soggetto a saturazione in cui la quantità massima di DA che può essere secreta nelle condizioni sperimentali osservate (DA_{max}) è pari a $193.4 \pm 5,51$ AUC mentre la quantità di nicotina capace di indurre la metà della secrezione di DA_{max} (K_{nic}) è di 0.2 ± 0.017 mM.

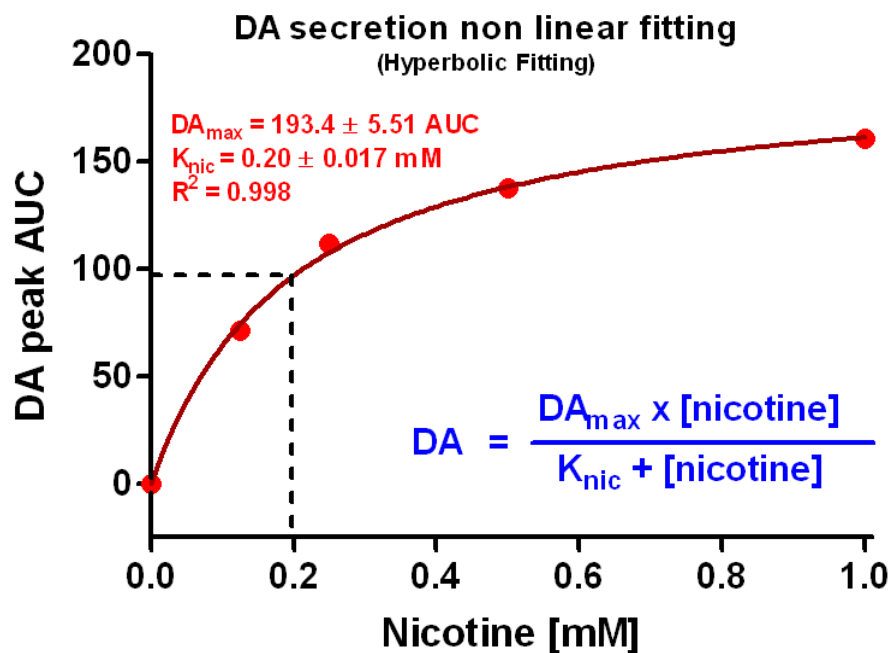


Fig. 30 Curva di Michaelis-Menten: relazione tra nicotina somministrata e secrezione di DA. DA_{max} = corrente massima secrezione di DA estrapolati dai dati sperimentali. K_{nic} = "costante Nicotine" indica la quantità di nicotina necessaria per la secrezione di metà della massima DA ($1/2 DA_{max}$).

4.6. Vitalità delle PC12 prima e dopo gli esperimenti di microdialisi

Il saggio di vitalità cellulare è stato effettuato come già descritto nella sezione materiali e metodi. Dopo la preparazione iniziale la vitalità delle cellule è testata con il colorante Trypan Blue utilizzando la camera di Burker per la conta. Le cellule PC12 sono state aspirate delicatamente nel tubo microdialitico in piccoli clusters o in singole cellule (Fig. 31A). La durata degli esperimenti di circa 5-6h e al termine la fine della microdialisi le cellule si trovano riaggregate in grandi cluster (Fig. 31B), tuttavia non è stata osservata una significativa diminuzione della vitalità cellulare infatti la vitalità finale è pari al $96.2 \pm 3.4\%$, $p < 0.05$, $n = 32$ e la mortalità finale è pari al $6.63 \pm 1.44\%$, $p < 0.05$, $n = 13$).

5. DISCUSSIONE

5.1. Microelettronica e caratteristiche elettrochimiche del microsensore della DA

Il modulo amperometrico del DCP è stato ottimizzato per il funzionamento a singola alimentazione (*single supply*) e a basso voltaggio grazie alla ripartizione del guadagno tra il primo e il secondo stadio di amplificazione. Confrontato con il nostro disegno precedente (Rocchitta et al., 2007), il guadagno è distribuito tra il convertitore I/V e il differenziatore. Come visto nella figura 26, fissando il valore di R_f a 10 M Ω , un differenziatore/amplificatore di precisione (AD626) controlla il fattore di amplificazione (1 nA/V). In questo modo abbiamo superato le limitazioni del progetto precedente (Rocchitta et al., 2007) relative alle variazioni intrinseche nei valori di resistenza, principalmente nel circuito differenziatore. Il risultato è che questo modello è caratterizzato dalla precisione del guadagno, della linearità e una eccellente risposta lineare. Il sistema può funzionare solo in modalità di ossidazione ed è particolarmente adatto a lavorare con sensori ad ossidazione diretta del substrato come i microsensori per la DA e i biosensori elettrochimici basati sulla produzione/ossidazione di H₂O₂ (O'Neill et al., 2008). Le caratteristiche del microsensore per la DA sono state valutate *in vitro* per più di 3 settimane mostrando una buona accuratezza e precisione. La DA, una volta secreta dalle cellule PC12 è metabolizzata dalle

catecol-O-metil-transferasi (COMT) a 3-MT (Serra et al., 2003a); tuttavia non sono state notate significative interferenze esponendo il microsensore per la DA alla 3-MT. Infatti, questo metabolita O-metilato è ossidato a un potenziale di 625 mV contro Ag/AgCl (Hebel e Serra, 2008), molto più elevato di quelli per la DA; il Nafion ha inoltre mostrato un abbattimento della corrente di ossidazione per questo metabolita rispetto alla sua ossidazione diretta su carbon-epoxy. Rispetto ai valori iniziali (giorno 1) è stata misurata una diminuzione di sensibilità al giorno 7, (al di sotto del 44% in condizioni di quiescenza e al di sotto del 45% in condizioni dinamiche) che è stata attribuita all' invecchiamento del microsensore. La simmetria tra i due microsensori usati in ogni esperimento, intesa come un decadimento parallelo e simultaneo delle correnti di DA registrate nei singoli sensori, si è mantenuta per l'intero periodo di prova (7 giorni). Una piccola differenza di base tra i sensori è stata ulteriormente corretta dal software (offset) 60 min prima di ogni esperimento. La F-TEC può essere utilizzata per una settimana senza problemi, eseguendo calibrazioni ogni giorno, immediatamente prima di ogni esperimento, come mostrato nei risultati. Dopo 1 mese di funzionamento continuo, abbiamo osservato una riduzione della sensibilità (al di sotto del 67% in condizioni dinamiche rispetto a quella misurata nel primo giorno) ed un aumento, a volte imprevedibile, dell'asimmetria tra i microsensori, legata probabilmente all'invecchiamento di RE o alla perdita del rivestimento di Nafion da parte del WE. La nanostrutturazione ha evidenziato un guadagno in termini di sensibilità di circa il 500% rispetto ai disegni precedentemente studiati. Tale vantaggio è stato

reso possibile solamente dalla funzionalizzazione superficiale dei sensori con MWCNT mentre la loro incorporazione all'interno della struttura del sensore non solo non ha offerto vantaggi ma ha addirittura ridotto di circa 2/3 la sensibilità del modello di riferimento.

5.2. Secrezione di DA da parte delle cellule PC12

Come visto nella sezione materiali e metodi e nei risultati, la calibrazione dinamica della DA è stata effettuata dopo l'aspirazione di soluzioni a differenti concentrazioni di analita nella camera microdialitica, ed è stata utilizzata per stimare la secrezione di DA da parte delle cellule PC12 nello spazio extracellulare. Dopo il caricamento delle PC12 è stato osservato un *overflow* iniziale di DA con una concentrazione massima di circa $1 \mu\text{M}/1.5 \times 10^6$ cellule, utilizzando un flusso di perfusione di $3 \mu\text{l}/\text{min}$. La concentrazione di DA decresce progressivamente in entrambi gli outlet durante i primi 80-120 min di perfusione con PBS-DMEM. Il picco iniziale di DA è dovuto principalmente alla manipolazione delle cellule prima del caricamento. Infatti lo stress meccanico delle PC12 durante la procedura di preparazione risulta in un aumento iniziale di DA. Il lavaggio della DA dal liquido extracellulare è stato attribuito principalmente al flusso di perfusione o alla conversione della DA a 3-MT da parte delle COMT (Rocchitta et al., 2005b; Serra et al., 2003b), piuttosto che al *reuptake* della DA da parte delle PC12. Infatti la perfusione con GBR-12783, un inibitore selettivo del trasportatore della DA (DAT) non ha influito sul tempo di *wash out* della DA dal

sistema. La DA ha quindi raggiunto un livello stazionario con una concentrazione $< 0.15 \mu\text{M}/1.5 \times 10^6$ cellule. L'esposizione al KCl, in presenza o assenza di Ca^{2+} extracellulare, ha indotto una secrezione di DA proporzionale al K^+ e al Ca^{2+} extracellulare ma anche in base al numero di cellule utilizzate nell'esperimento. Sulla base delle suddette osservazioni, ΔC_L e ΔC_{KCl} potrebbero essere utilizzati per calcolare il numero di cellule PC12 caricate nel capillare microdialitico.

I risultati ottenuti a seguito della stimolazione nicotinic evidenziano una saturabilità del sistema in termini di secrezione di DA. Tale fenomeno, pur quantificabile in modo accurato è di difficile interpretazione. Se da un lato infatti l'interrelazione iperbolica esistente tra DA secreta e nicotina utilizzata per indurre la secrezione suggerisce una saturazione recettoriale, d'altro canto non è da escludere un ruolo importante da attribuire ai meccanismi post-recettoriali o, più semplicemente, al numero di cellule utilizzare sperimentalmente. Tali aspetti saranno oggetto di indagine approfondita in future ricerche.

Nell'insieme i risultati ottenuti confermano i precedenti risultati *in vitro* basati sull'analisi cromatografica (HPLC) del microdializzato (Serra et al., 2003a), sia in termini di concentrazione di DA che della sua secrezione nel tempo. Il capillare microdialitico può essere utilizzato continuamente, per l'intero arco di 24h senza che si possa osservare una diminuzione della sua funzionalità. Il caricamento delle PC12, invece, può essere eseguito solo una volta a causa dell'iniziale adesione cellulare e della perdita di performance della membrana da dialisi (*fouling*). Ciò richiede l'uso di un nuovo capillare microdialitico per ogni esperimento, mentre la F-TEC può essere utilizzata al

massimo per una settimana. Le differenze di prestazione del capillare microdialitico, legate alla procedura di costruzione, sono state eliminate eseguendo giornalmente calibrazioni immediatamente prima degli esperimenti, come illustrato nella sezione materiali e metodi. Una limitazione del sistema, relativa all'uso della tecnica microdialitica, è che le dinamiche della secrezione di DA nel tempo sembrano essere registrate più lentamente rispetto a quelle evidenziate con esperimenti fatti con fibre di carbonio adiacenti alle cellule PC12 (Sasakawa et al., 2005; Green et al., 2001). Tuttavia, confrontato con un precedente studio di microdialisi *in vitro* (Chiou et al., 2005), il presente modello, caratterizzato dal piccolo volume della camera dialitica e dall'elevato numero di cellule in essa contenuto offre il vantaggio di ridurre il volume del compartimento extracellulare, aumentare il gradiente di concentrazione della DA attraverso la membrana microdialitica, e aumentare la risposta del sistema alla secrezione di DA.

5.3. Vitalità cellulare

Come già riportato nei risultati, non è stata osservata una significativa diminuzione della vitalità cellulare alla fine degli esperimenti. Infatti sono stati condotti esperimenti di controllo caricando le cellule PC12 all'interno del capillare microdialitico e lasciandole nelle stesse condizioni sperimentali standard per più di 12h a un flusso di perfusione pari a 3 μ l/ min senza una significativa diminuzione della

vitalità cellulare. Solo dopo esperimenti condotti per 24h la vitalità era scesa al di sotto del 95%.

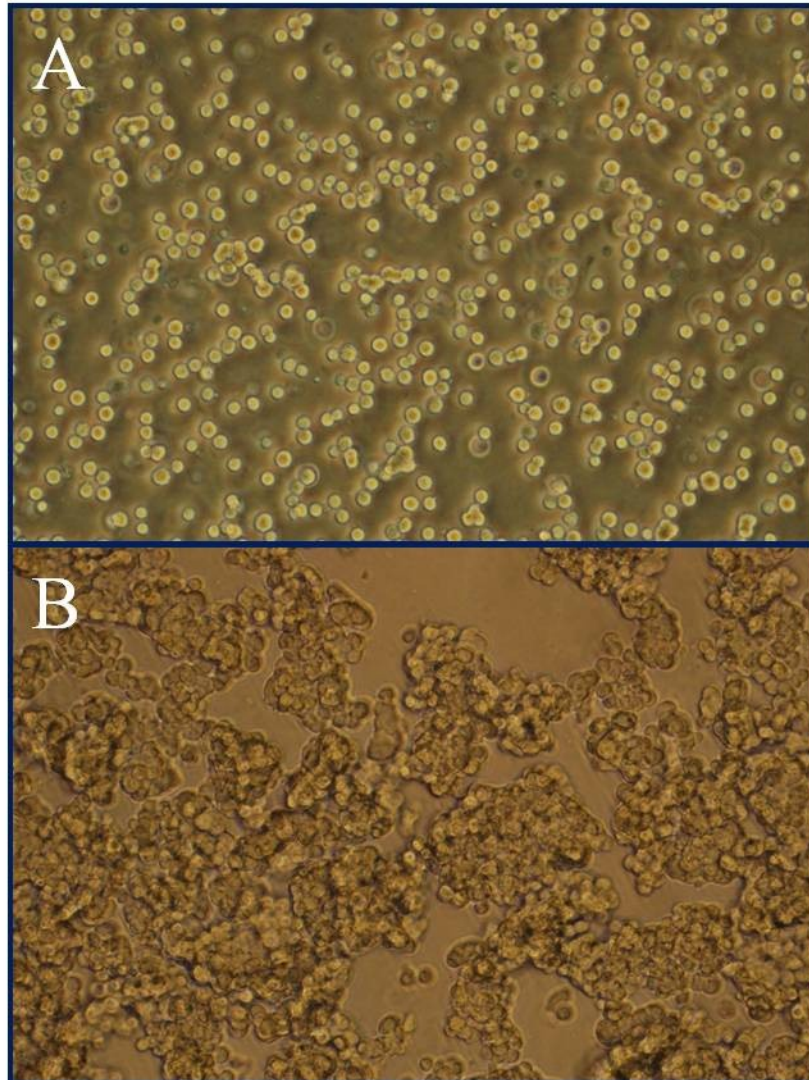


Fig. 31. Microfotografia delle cellule PC12 prima e dopo il caricamento nel capillare microdialitico. **A:** Le cellule PC12 sono aspirate delicatamente nel capillare in piccoli cluster o single cells usando una siringa Hamilton da 1 ml. **B:** Alla fine degli esperimenti le PC12 si trovano aggregate in grandi cluster. Non è stata osservata una diminuzione della vitalità (96%).

6. CONCLUSIONI

Nel presente studio abbiamo modificato un disegno già esistente di un doppio sistema microdialitico *in vitro* accoppiato a sensori per la determinazione dinamica della DA secreta dalle cellule PC12. Il nuovo sensore nanostrutturato messo a punto si basa sull'utilizzo di MWCNT distribuiti su un disco di epoxy-grafite. E' stato validato un protocollo sperimentale trattato-controllo per rilevare la secrezione di DA indotta da KCl e nicotina. Il sistema microdialitico è stato calibrato e testato in differenti condizioni sperimentali. Questo nuovo sistema serve come modello rapido e affidabile per studiare gli effetti di diversi farmaci sulla secrezione di DA da parte delle cellule PC12. Diversi tipi di cellule potrebbero essere studiati, e il microsensore per la DA potrebbe essere facilmente sostituito con diversi sensori o biosensori che consentono il rilevamento *in vitro* di altre molecole quali il nitrossido, il glutammato, il glucosio, e il lattato. L'ulteriore miniaturizzazione dell'elettronica e l'integrazione con pompe peristaltiche ultraminiaturizzate potrebbe consentire la realizzazione di un sistema a basso costo per un rapido screening *in vitro* dei farmaci.

7. BIBLIOGRAFIA

- Benveniste H.**, Hansen A.J., Ottosen N.S. Determination of brain interstitial concentrations by microdialysis.: *J. Neurochem.* 52 (1989) 1741–1750.
- Calne D.B.**, Langston J.W. Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet* 2 (1983) 1457–1459.
- Chiou S.H.**, Kao C.L., Chang Y.L., Ku H.H., Tsai Y.J., Lin H.T., Yen C.J., Peng C.H., Chiu J.H., Tsai T.H.: Evaluation of anti-Fas ligand-induced apoptosis and neural differentiation of PC12 cells treated with nerve growth factor using small interfering RNA method and sampling by microdialysis. *Anal. Biochem.* 363 (2007) 46–57.
- Davis G.C.**, William A.C., Markley S.P., Ebert M.H., Caine E.D., Reichert C.M.: Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psych. Res.* 1 (1979) 249–254.
- Dearry A.G.**, Gingrich J., Falardeau P., Fremeau R.T., Bates M.D. and Caron M.G.: Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347 (1990) 72-76.
- Doherty M.D.**, Gratton A.: Medial prefrontal cortical D1 receptor modulation of the meso-accumbens dopamine response to stress: An electrochemical study in freely-behaving rats. *Brain Res.* 715 (1996) 86–97.
- Duvoisin R.V.**, Golbe L.I.: Kindreds of dominantly inherited Parkinson's disease: Keys to the riddle. *Ann. Neurol.* 38 (1995) 355–366.
- Finberg J.P.**, Youdim M.B.: Selective MAO A and B inhibitors: their mechanism of action and pharmacology. *Neuropharmacology* 22 (1983) 441–446.
- Fornai F.**, Lenzi P., Lazzeri G., Ferrucci M., Fulceri F., Giorni F.S., Falleni A., Ruggieri S., Paparelli A.: Fine ultrastructure and biochemistry of PC12 cells: A comparative approach to understand neurotoxicity. *Brain Res.* 1129 (2007) 174–190.
- Gordito M.P.**, Kotsis D.H., Minteer S.D., Spence D.M.: Flow-based amperometric detection of dopamine in an immobilized cell reactor. *J. Neurosci. Methods* 124 (2003) 129–134.
- Gowers WR.** A manual of disease of the nervous system. Philadelphia: Blackiston; 1888.
- Grandy D.K.**, Marchionni M.A., Makam H., Stofko R.E., Alfano M., Frothingham L., Fischer J.B., Burke-Howie K.J., Bunzow J.R., Server A.C. and Civelli O.: Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 9762-9766.

- Green K.N.**, Taylor S.C., Smith I.F., Peers C.: Differential coupling of voltage gated Ca^{2+} channels to catecholamine secretion from separate PC12 cell batches. *Neurosci. Lett.* 301 (2001) 13–16.
- Greene L.A.**, Rein G.: Short-term regulation of catecholamine biosynthesis in a nerve growth factor responsive clonal line of rat pheochromocytoma cells. *J. Neurochem.* 30 (1978) 549–555.
- Greene L.A.**, Rein G.: Release storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive phaeochromocytoma cells. *Brain Res.* 129 (1977) 247–263.
- Greene L.A.**, Tischler A.S.: Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal phaeochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 73 (1976) 2424–2428.
- Hebel M.**, Serra P.A.: Development of a parallel-computing embedded telemetry system for voltammetric microsensor and biosensor applications, in: M.-I. Baraton (Ed.), *Sensors for Environment, Health, and Security: Advanced Materials and Technologies*, Springer NATO–ASI Books, Dordrecht, Netherlands, 2008.
- Hornykiewicz O.**, Kish S.J.: Biochemical pathophysiology of Parkinson’s disease. *Adv. Neurol.* 45 (1986) 19–34.
- Joyce B.M.**, Glaser P.E., Gerhardt G.A.: Adderall® produces increased striatal dopamine release and a prolonged time course compared to amphetamine isomers. *Psychopharmacology* 191 (2007) 669–677.
- Langston J.W.**, Ballard P.A., Tetrud J.W., Irwin I.: Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219 (1983) 979–980.
- Liu Y.**, Fallo, L., Lashuel H.A., Liu Z., Lansbury P.T. Jr.: The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 108–113.
- Migheli R.**, Godani C., Sciola L., Delogu M.R., Serra P.A., Zangani D., De Natale G., Miele E., Desole M.S.: Enhancing effect of manganese on l-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: Role of oxidative stress. *J. Neurochem.* 73 (1999) 1155–1163.
- 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. *Anal. Biochem.* 380 (2008) 323–330.

- Monsma F.J.**, Mahan L.C., Mcvittie L.D., Gerfen C.R., Sibley D.R.: Molecular Cloning and Expression of a D1 Dopamine Receptor Linked to Adenyl Cyclase Activation. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87 (1990) 6723-6727.
- O'Neill R.D.**, Lowry J.P., Rocchitta G., McMahon C.P., Serra P.A.: Designing sensitive and selective polymer/enzyme composite biosensors for brain monitoring *in vivo*. *Trends Anal. Chem.* 1 (2008) 78–88.
- O'Neill R.D.**: Long-term monitoring of brain dopamine metabolism *in vivo* with carbon paste electrodes. *Sensors* 5 (2005) 317–342.
- Patrick H.U.**, Levy P.M.: Parkinson's disease. A clinical study of one hundred and forty-six cases. *Arch. Neurol. Psychiat.* 7 (1922) 711–720.
- Poskanzer D.C.**, Schwab R.S.: Cohort analysis of Parkinson's disease: evidence for a single etiology related to subclinical infection. *J. Chronic. Dis.* 16 (1963) 961–73.
- Ramírez-García S.**, Alegret S., Céspedes F., Forster R.J.: Carbon composite electrodes: Surface and electrochemical properties. *Analyst* 127 (2002) 1512–1519.
- Rocchitta G.**, Migheli R., Mura M.P., Esposito G., Desole M.S., Miele E., Miele M., Serra P.A.: Signalling pathways in the nitric oxide donor-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: Evidence that exogenous nitric oxide promotes Ca²⁺ entry through store-operated channels. *Brain Res.* 1023 (2004) 243–252.
- Rocchitta G.**, Migheli R., Mura M.P., Esposito G., Marchetti B., Miele E., Desole M.S., Miele M., Serra P.A.: Signaling pathways in the nitric oxide and iron induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: Role of extracellular Ca²⁺ and l-type Ca²⁺ channels. *Brain Res.* 1047 (2005) 18–29.
- Rocchitta G.**, Migheli R., Mura M.P., Esposito G., Marchetti B., Miele E., Desole M.S., Serra P.A.: Role of endogenous melatonin in the oxidative homeostasis of the extracellular striatal compartment: A microdialysis study in PC12 cells *in vitro* and in the striatum of freely moving rats. *J. Pineal Res.* 39 (2005) 409–418.
- 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. *Sens. Actuat. B* 126 (2007) 700–709.
- Roda L.G.**, Nolan J.A., Kim S.U., Hogue-Angeletti, R.A.: Isolation and characterization of granules from a pheochromocytoma cell line. *Exp. Cell Res.* 8 (1980) 103–111.

- Sampath D.**, Jackson G.R., Werrbach-Perez, K., Perez-Polo J.R.: Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells. *J. Neurochem.* 62 (1994) 2476–2479.
- Sasakawa N.**, Murayama N., Kumakura K.: Characterization of exocytotic events from single PC12 cells: Amperometric studies in native PC12h, Daloaded PC12h, and bovine adrenal chromaffin cells, *Cell. Mol. Neurobiol.* 25 (2005) 777–787.
- Semchuk K.K.**, Love E.J., Lee R.G.: Parkinson's disease: A test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology.* 46 (1993) 1173-80.
- Serra P.A.**, Rocchitta G., Delogu M.R., Migheli R., Taras M.G., Mura M.P., Esposito G., Miele E., Desole M.S., Miele M.: Role of the nitric oxide/cyclic GMP pathway and extracellular environment in the nitric oxide donor-induced increase in dopamine secretion from PC12 cells: A microdialysis in vitro study. *J. Neurochem.* 86 (2003a) 1403–1413.
- Serra P.A.**, Migheli R., Rocchitta G., Taras M.G., Mura M.P., Delogu M.R., Esposito G., Desole M.S., Miele E., Miele M.: Role of the nitric oxide/cyclic GMP pathway and ascorbic acid in 3-morpholiniosydnonimine (SIN-1)-induced increases in dopamine secretion from PC12 cells: A microdialysis in vitro study. *Neurosci. Lett.* 353 (2003b) 5-8.
- 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. *Sens. Actuat. B* 122 (2007) 118–126.
- Sokoloff P.**, Giros B., Martres M.P., Bouthenet M.L., Schwartz J.C.: Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347 (1990) 146-151.
- Sunahara, R.K.**, Niznik H.B., Weiner D.B., Stormann T.M., Brann M.R., Kennedy J.L., Gelernter J.E., Rozmahel R., Yang Y., Israel Y., Seeman P., O'Dowd B.F.: Human D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 347 (1990) 80-83.
- Sunahara R.K.**, Guan H.C., O'Dowd B.F., Seeman P., Laurier L.G., George S.R., Torchia J., Van Tol H.H.M., Niznik H.B.: Cloning of a human dopamine D5 gene with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350 (1991) 614-619.
- Van Tol H.H.M.**, Bunzow J.R., Guan H.C., Sunahara R.K., Seeman P., Niznik H.B., Civelli O.: Cloning of a human dopamine D4 receptor gene with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350 (1991) 610-614.

- Spillantini M.G.**, Schmidt M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes R., Goedert M.: Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 388 (1997) 839–840.
- Taylor C.A.**, Sainte-Hilaire M.H., Cupples L.A., Thomas C.A., Burchard A.E., Feldman R.G., Myers R.H.: Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: A new England based case control study. *Am. J. Med. Genet.* 88 (1999) 742–749.
- Tischler A.S.**: Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 971 (2002) 366–370.
- Vaccaro K.K.**, Liang B.T., Perelle B.A., Perlman R.L.: Tyrosine 3-monooxygenase regulates catecholamine synthesis in pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 6539–6541.
- Youdim M.B.**: PC12 cells as a window for the differentiation of neural crest into adrenergic nerve endings and adrenal medulla. *J. Neural Transm.* 34 (1991) 61–67.
- Yuyama K.**, Yamamoto H., Nakamura K., Kato T., Sora I., Yamamoto T.: Resistance of PC12 cells against nitric oxide (NO)-induced toxicity in longterm culture: Implication of neuronal NO synthase expression. *Neurosci. Lett.* 309 (2001) 169–172.
- Wightman R.M.**, Robinson D.L.: Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with “reward”. *J. Neurochem.* 82 (2002) 721–735.
- Zhou Q.Y.**, Grandy D.K., Thambi L., Kushner J.A., Van Tol H.H.M., Cone R., Pribnow D., Salon, J., Bunzow J.R., Civelli O.: Cloning and expression of human and rat D1 receptors. *Nature* 347 (1990) 76-80.