



Università degli studi di Sassari

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Materno Infantili

Sezione di Farmacologia

(Direttore: Prof.ssa Maria Speranza Desole)

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze XXI Ciclo

**Sviluppo di un nuovo sistema voltammetrico
microdialitico per lo studio delle variazioni
neurochimiche in cellule neuronali in coltura**

Tutor:

Dott.ssa Rossana Migheli

Coordinatore:

Prof. Egidio Miele

Tesi di dottorato della Dott.ssa Sonia Dedola

Anno Accademico 2007-2008

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	pag. 1
1.1. Morbo di Parkinson.....	pag. 2
<i>1.1.1. Eziologia</i>	<i>pag. 5</i>
<i>1.1.2. Fattori genetici</i>	<i>pag. 9</i>
<i>1.1.3. Patogenesi</i>	<i>pag. 11</i>
1.2. Voltammetria	pag. 15
1.3. Microdialisi	pag. 19
1.4. PC12.....	pag. 22
1.5. Determinazione elettrochimica della DA	pag. 26
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	pag. 30
3. MATERIALI E METODI	pag. 32
3.1. Reagenti e soluzioni.....	pag. 33
3.2. Materiali e componenti elettriche	pag. 34
3.3. DPC: disegno e costruzione.....	pag. 34
3.4. Firmware e software	pag. 36
3.5. Microsensore per la DA e cella elettrochimica <i>Flow-trough.....</i>	<i>pag. 37</i>
3.6. Costruzione tubo capillare per la microdialisi <i>in vitro</i>.....	pag. 40
3.7. Drug reservoir e fluid mixer	pag. 42
3.8. Coltura cellulare.....	pag. 46
3.9. Procedura degli esperimenti.....	pag. 46
3.10. Analisi cromatografia del dializzato della sospensione delle cellule PC12	pag. 47

3.11. Saggio di vitalità cellulare	pag. 48
3.12. Analisi statistica	pag. 48
4. RISULTATI	pag. 49
4.1. Caratterizzazione statica e dinamica del microsensore per la DA.....	pag. 50
4.2. Effetti di concentrazioni crescenti di DA in camera microdialitica e del flusso di perfusione sulle correnti di DA...	pag. 51
4.3. Effetto del numero delle PC12 sul rilascio di DA	pag. 53
4.4. Effetto del KCl sulla secrezione di DA in presenza o meno di Ca ²⁺ extracellulare.....	pag. 54
4.5. Vitalità delle PC12 prima e dopo gli esperimenti di microdialisi	pag. 56
5. DISCUSSIONE.....	pag. 57
5.1. Microelettronica e caratteristiche elettrochimiche del microsensore per la DA.....	pag. 58
5.2. Secrezione di DA da parte delle cellule PC12.....	pag. 59
5.3. Vitalità cellulare	pag. 61
6. CONCLUSIONI	pag. 63
7. RIASSUNTO	pag. 65
8. BIBLIOGRAFIA.....	pag. 67

1. INTRODUZIONE

1.1. Malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (MP) è una malattia neurodegenerativa ad andamento progressivo con sintomi prevalentemente motori e caratteristici e deve il suo nome al medico inglese James Parkinson, che nel 1917 scrisse un trattato sulla paralisi agitante. Questa malattia è caratterizzata da una triade di segni clinici: rigidità muscolare, tremore e 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. Le sindromi parkinsoniane, sono caratterizzate da una somiglianza clinica con l'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:

- a) iatrogeni, indotti da neurolettici o da antagonisti della dopamina (DA);
- b) neurotossici (come quelli indotti da 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina, MPTP);
- c) genetici (PARK1 e PARK2);
- d) quelli che comprendono la Paralisi Sopranucleare Progressiva (PSP), l'Atrofia Sistemica Multipla (ASM) e la demenza con i corpi di Lewy.

A livello epidemiologico, l'incidenza della MP è 10 volte maggiore di quella dei parkinsonismi atipici. La MP è un disturbo dell'età media o avanzata con un'incidenza maggiore negli uomini, che varia da 4,5 a 21

casi l'anno per 100.000 (interessa circa il 10% dei soggetti al di sopra dei 65 anni), con una progressione graduale e un decorso prolungato (Olanow et al., 1999), con un conseguente impatto sociale molto elevato per morbilità e mortalità.

La malattia è causata dalla progressiva perdita dei neuroni dopaminergici della zona compatta della *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc), un nucleo dei gangli della base situato nel mesencefalo dorsale e di altri nuclei pigmentati del tronco encefalico, come il *Locus Coeruleus* (LC) e si manifesta quando la perdita neuronale ha interessato oltre l'80% della popolazione cellulare. Una diagnosi accurata è possibile osservando in analisi *post-mortem* i corpi di Lewy, inclusioni citoplasmatiche neuronali, che rappresenta uno dei punti cruciali nello studio di questa patologia. Questi sono costituiti da aggregati proteici, quindi eosinofili che contengono α -sinucleina (Spillantini et al., 1997) e da proteine correlate al sistema ubiquitina-proteasoma (UP) quali ubiquitina, parkina, ubiquitina-C-idrolasi-L1 (Uch-L1) (Liu et al., 2002).

Da un punto di vista biochimico, a livello della SNpc di soggetti parkinsoniani sono state accertate una riduzione della quantità di DA (Hornykiewicz et al., 1986), una perdita della pigmentazione caratteristica (minor concentrazione di neuromelanina), una riduzione dell'attività del complesso I della catena respiratoria mitocondriale e una minore attività dell' α -chetoglutarato deidrogenasi.

Inoltre, la presenza di elevati livelli di ioni ferrosi e ferrici non legati alla ferritina insieme ad una consistente riduzione della quantità di glutatione in forma ridotta (GSH) senza un aumento di concentrazione della sua forma ossidata (GSSG) indicano un'intensa situazione di stress ossidativo (Olanow et al., 1999).

Sebbene l'eziologia della MP sia ancora sconosciuta è ormai accettata l'ipotesi di un'origine multifattoriale che caratterizza questa malattia e in cui interagiscono sia componenti ambientali che genetiche (Semchuk et al., 1993; Taylor et al., 1999). Nel corso degli anni sono stati proposti diversi fattori eziologici: ereditarietà (Gowers, 1888), lesioni cerebrali (Patrick et al., 1922), infezioni (Poskanzer et al., 1963), neurotossine endogene (Davis et al., 1979; Langston et al., 1983), fattori ambientali (Calne et al., 1983) e alterate espressioni geniche (Duvoisin et al., 1995).

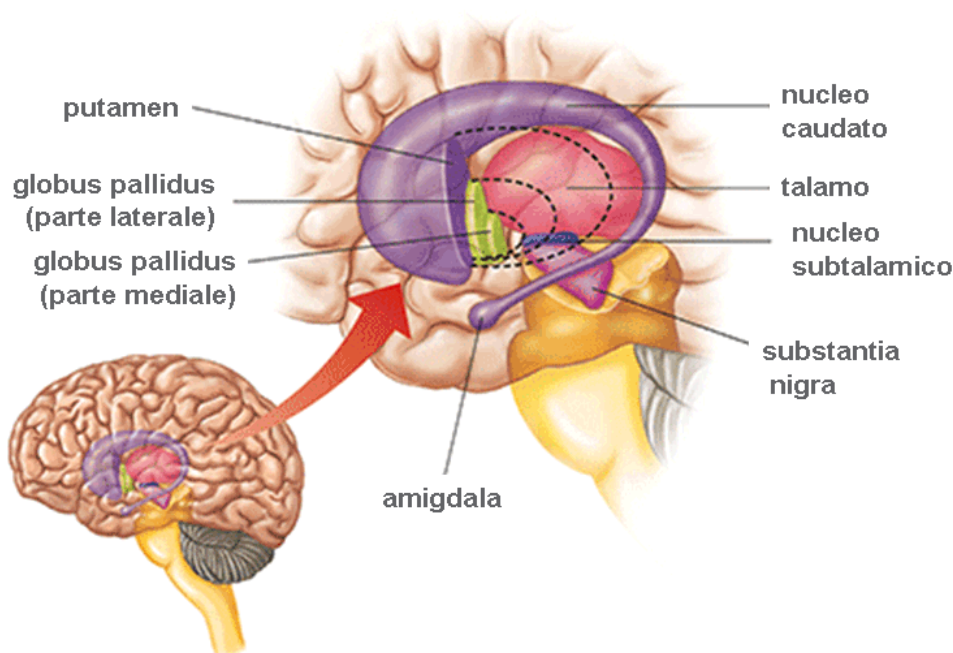


Fig. 1. Schema rappresentativo dei nuclei che costituiscono i gangli della base compresi la pars compacta della substantia nigra (SNpc) ed il nucleo caudato, che costituisce,

assieme ad altri nucleo il corpo striato, sede delle terminazioni dopaminergiche della via nigro-striatale.

1.1.1. Eziologia

Studi epidemiologici indicano che alcuni fattori ambientali e occupazionali possono aumentare il rischio d'insorgenza della malattia. Questi includono l'esposizione a tossine esogene quali pesticidi (Paraquat, Rotenone), metalli (Al, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Zn), altri xenobiotici (es. il monossido di carbonio) e prodotti chimici industriali (MPTP, solventi organici), stile di vita (dieta e fumo), luogo di residenza (ambiente rurale) e attività professionale (lavoro agricolo) (Lai et al., 2002).

Diversi studi mostrano una correlazione positiva fra la MP e l'esposizione sia acuta che cronica a pesticidi (Jiménez-Jiménez et al 1992; Gorell et al., 1998,). L'esposizione a erbicidi, insetticidi e fungicidi avviene attraverso l'assunzione di acqua e cibo contaminato, per contatto cutaneo o attraverso inalazione diretta. I pesticidi esplicano la loro tossicità attraverso diversi meccanismi: disfunzione mitocondriale per inibizione del complesso I (Gassner et al., 1997; Greenmyre et al., 1999), modulazione di enzimi quali citocromo P450 e glutazione transferasi (Hodgson et al., 1996; Di Ilio et al., 1996), tossicità attraverso un meccanismo sinergico (Thiruchelvam et al., 2000).

- Rotenone

Il rotenone è un pesticida usato in agricoltura che inibisce il complesso I mitocondriale. Questo pesticida permette di riprodurre le caratteristiche della MP in animali trattati che sviluppano una lesione dopaminergica nigrostriatale e presentano una riduzione del movimento, una postura flessa e in alcuni casi rigidità; inoltre si osserva a livello citoplasmatico dei

neuroni nigrali la presenza di inclusioni contenenti α -sinucleina (Betarbet et al., 2000).

Tuttavia il rotenone può determinare un'azione tossica anche sui neuroni GABAergici, infatti, la concentrazione di rotenone e il grado di inibizione del complesso I risultano uniformi in tutte le aree cerebrali. Vi sono dati che indicano come la maggiore degenerazione del sistema dopaminergico sia dovuta alla particolare sensibilità di questi neuroni al blocco del complesso I mitocondriale (Greenamyre et al., 2003). Nel modello del rotenone si ha inoltre un' aumentata espressione di α -sinucleina che può diventare insolubile e dar luogo ad inclusi citoplasmatici. Tramite inibizione della catena respiratoria mitocondriale, il rotenone produce un'inibizione del sistema UP (Hoglinger et al., 2003). Il modello del rotenone è stato il primo modello sperimentale basato sull' esposizione ad un agente ambientale in grado di determinare la formazione di inclusioni in associazione con la comparsa di danno a livello dei neuroni dopaminergici nigrostriatali. Questo modello trova attualmente un impiego diffuso nello studio delle basi molecolari della formazione di inclusi e del loro legame con i processi di morte cellulare.

- MPTP

L'MPTP è un derivato della Meperidina, una sostanza sintetica ad effetto analgesico-narcotico (detta anche "eroina sintetica"). Questa neurotossina ha contribuito notevolmente a chiarire alcuni meccanismi della MP in quanto causa una patologia che mima i suoi sintomi neurologici, quali tremori, rigidità, lentezza dei movimenti, instabilità posturale. Nel 1979 fu descritto il primo caso di parkinsonismo dovuto ad assunzione di questa sostanza sintetizzata artigianalmente.

Questa molecola si lega con elevata affinità alle cellule dopaminergiche della SNpc distruggendole e la sua tossicità è legata alla conversione endogena nel metabolita MPP⁺. Tale conversione avviene in due fasi:

1. Conversione dell'MPTP in un metabolita intermedio attraverso l'azione degli enzimi monoaminoossidasi-B (MAO-B)
2. Conversione spontanea del metabolita intermedio in MPP⁺. Affinché l'MPP⁺ svolga la sua azione tossica è necessario che venga trasportato all'interno della cellula tramite il sistema di trasporto della DA (re-uptake).

Questa neurotossina causa un blocco a livello della catena respiratoria del complesso I mitocondriale, determinando nell'uomo e negli altri primati una sindrome irreversibile.

Con questa neurotossina si ottiene una perdita massiva di fibre dopaminergiche nigrostriatali insieme a una deplezione di DA ed alla comparsa di una sintomatologia sovrapponibile a quella osservata nel corso della MP. L'uso di questo modello ha permesso di individuare importanti alterazioni nel metabolismo cellulare correlate a stress ossidativo o a disfunzioni mitocondriali.

L'MPTP somministrato in acuto non è tuttavia in grado di determinare la formazione di corpi di Lewy e la perdita neuronale nel LC tipica della MP (Forno et al., 1986; Forno et. al., 1993).

Un recente studio (Fornai et al., 2005) ha evidenziato che gli animali trattati in maniera continua, diversamente da quelli sottoposti ad una somministrazione sporadica, presentano una sindrome parkinsoniana dose-dipendente con formazione di inclusioni contenenti α -sinucleina e riduzione dell'attività del sistema UP.

Inoltre l'infusione continua di MPTP determina un effetto degenerativo anche a livello del LC dove i neuroni noradrenergici sopravvissuti presentano inclusioni neuronali contenenti α -sinucleina e ubiquitina.

Questi risultati dimostrano che l'inibizione continua del complesso I mitocondriale incrementa il danno ossidativo e inibisce la funzione del sistema UP, la quale rappresenta la via finale comune nella patogenesi delle sindromi parkinsoniane (Chung et al., 2001; Fornai et al., 2003; Hoglinger et al., 2003; Greenamyre e Hastings, 2004).

- Metalli

L'associazione fra Mn e Cu per soggetti con più di 20 anni di esposizione occupazionale sembra essere significativa (Gorell et al. 1999). Inoltre, esposizioni croniche a combinazioni di Fe e Cu, Pb e Cu, Pb e Fe costituiscono un rischio maggiore di sviluppare la MP che non l'esposizione al singolo metallo (Gorell et al. 1999b.). Inoltre l'esposizione occupazionale a Cu, Fe o Pb incrementa il rischio in soggetti con storia familiare positiva (Rybicki et al. 1999). Un recente studio ha dimostrato che la contemporanea presenza di specifici pesticidi e metalli, come il dietilditiocarbammato e Al^{3+} , è in grado di indurre un cambiamento conformazionale dell' α -sinucleina e accelerare il fenomeno di aggregazione in fibrille che porta alla formazione dei corpi di Lewy (Uversky et al. 2002).

- Nicotina

Studi epidemiologici dimostrano un'associazione inversa tra il fumo di sigaretta e l'insorgenza della MP (Gorell et al., 1999c; Grandinetti et al., 1996), infatti sembra che il fumo diminuisca di circa il 50% il rischio per il Parkinson (Quik, 2004).

A tal riguardo, sono stati evidenziati diversi meccanismi con cui la nicotina potrebbe avere un ruolo protettivo: stimolare il rilascio di DA (Janson et al., 1992,), stimolare direttamente i recettori nicotinici presinaptici, inibire enzimi come la monoammino-ossidasi (MAO) e preservare i neuroni nigrali da metaboliti tossici prodotti enzimaticamente (Baron, 1986).

1.1.2. Fattori genetici

Circa il 5-10% dei pazienti colpiti da MP soffrono di una forma familiare della malattia e mostrano un modello di ereditarietà autosomica dominante. I fattori genetici giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della MP.

Sulla base di questi dati sono stati sviluppati alcuni modelli sperimentali sia *in vivo*, tramite l'utilizzo di animali transgenici, che *in vitro* su colture cellulari transfettate, che hanno permesso di ampliare le conoscenze sul MP.

- Alfa-sinucleina

L' α -sinucleina è una proteina neuronale coinvolta, sia in forma nativa che mutata, in diverse patologie neurodegenerative, definite per questo sinucleinopatie (Dev et al., 2003). Alcune mutazioni puntiformi (A53T, A30P e E46K) nel gene che codifica per l' α -sinucleina sono correlate alla comparsa di una rara forma giovanile autosomica dominante di MP (Polymeropoulos et al., 1997; Kruger et al., 1998; Zarranz et al., 2004) mentre la sovraespressione di α -sinucleina nativa, determinata da una triplicazione genica, causa una MP familiare severa (Singleton et al., 2003; Farrer et al., 2004).

La sovraespressione di α -sinucleina nativa o l'espressione in quantità normali di una forma alterata può quindi essere capace di determinare morte cellulare a livello dei neuroni dopaminergici e di causare disturbi del movimento.

Vari modelli genetici basati sulla sovraespressione di α -sinucleina normale o mutata nel topo, nella *Drosophila* e cellulari confermano che questa proteina gioca un ruolo chiave nella formazione di inclusioni analoghe ai corpi di Lewy (Masliah et al., 2000; van der Putten et al., 2000; Feany e Bender, 2000; Stefanis et al., 2001).

- Parkina

Il prodotto del gene Parkin (Parkina) è un enzima con attività ubiquitin-ligasica che sembra agire come ligasi per la proteina ubiquitina E3 che appartiene al sistema UP. Il suo mancato funzionamento dovuto a mutazioni nel gene Parkin porta a un malfunzionamento della via UP che non è più in grado di identificare proteine anomale e di permettere così al sistema di degradarle. La conseguenza è un accumulo di proteine anomale con effetto tossico sulla cellula (Shimura et al., 2000; Chung et al., 2001).

Una compromissione del sistema di riconoscimento e di processazione delle proteine alterate è quindi la causa dello sviluppo di questa forma di Parkinson.

Un modello animale di topo knock-out per la parkina, recentemente sviluppato ha evidenziato da un lato l'assenza di inclusioni neuronali dall'altro, in contrasto con i precedenti studi, l'assenza di alterazioni a livello nigrostriatale, del sistema noradrenergico o deficit cognitivi (Perez e Palmiter, 2005).

Ci sono anche evidenze scientifiche che maggiori livelli di parkina abbiano un effetto neuroprotettivo riuscendo a sopprimere l'effetto tossico di proteine anomale (Imai et al., 2000).

- DJ-1

Nei pazienti con MP sono state osservate due mutazioni nel gene DJ-1, una delezione di alcuni esoni che previene la sintesi della proteina, una

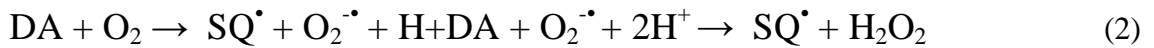
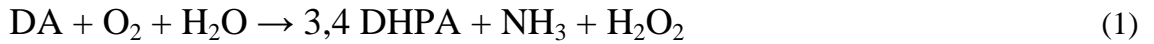
mutazione puntiforme (Leu166Pro) che rende la proteina meno stabile e promuove la sua degradazione per merito del sistema UP (Bonifati et al., 2003). L'uso di topi incapaci a sintetizzare la DJ-1 ha evidenziato come, sebbene i livelli di dopamina nello striato e il numero di neuroni nella SNpc siano normali, questi animali presentino ridotta mobilità se trattati con anfetamina e, se sottoposti a MPTP, abbiano una maggior perdita di neuroni ed una maggior denervazione a livello striatale.

I neuroni di embrioni di topi DJ-1 sono maggiormente sensibili agli stress ossidativi. Questi dati sono confortati dal fatto che se tramite un vettore adenovirale si riporta a livelli normali la sintesi di DJ-1 gli effetti neurodegenerativi si annullano. Anche in animali non mutati si osserva che se, sempre tramite un vettore virale, aumentiamo i livelli di DJ-1 le cellule subiscono minori danni neuronali indotti da MPTP mentre la sovraesposizione di DJ-1 *in vitro* determina una maggior resistenza a stress ossidativi (Kim et al., 2005), confermando il ruolo neuroprotettivo del DJ-1 nei confronti dello stress ossidativi e che una perdita di DJ-1 possa concorrere alla patogenesi della MP.

1.1.3. Patogenesi

I neuroni dopaminergici sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo perché la dopamina è metabolizzata in perossido di idrogeno (H_2O_2) e altre specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Halliwell et al., 1985; Olanow, 1990) quali il radicale superossido ($O_2^{\bullet-}$), il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale ossidrilico (OH^{\bullet}) e l'ossigeno singoletto (1O_2) (Ebadi et al., 2001) che possono portare all'alterazione di una varietà di molecole biologiche (DNA, proteine e lipidi). Nei neuroni la DA può essere metabolizzata sia dalle MAO in 3,4- diidrossifenilacetaldeide (3,4-DHPA)

e ammoniacca (1) che, per auto-ossidazione non enzimatica, in radicale semichinone (SQ[•]) (2).



L'H₂O₂ e l'O₂^{•-} sono normalmente eliminati da reazioni enzimatiche coinvolgenti le superossido dismutasi (SOD), la glutatione perossidasi (GPO) e le catalasi. Una concentrazione costante di H₂O₂ accompagnata da un aumento significativo di Fe⁺² può portare alla reazione di Fenton con formazione del radicale OH[•]. È stato dimostrato che la neuromelanina (NM), accumulo-riduzione del ferro nella SN, può incrementare la produzione del radicale ossidrile, legare i metalli come il Fe, promuoverne la riduzione e generare, quindi, lo stato di valenza utile per la reazione di Fenton (Ben Shachar et al., 1991) o la reazione di Haber-Weiss. Questi processi catalitici possono richiedere l'intervento di specie endogene riducenti, quali altri metalli di transizione (Cu e Mn) oltre alla neuromelanina (Zecca et al. 2000).

I mitocondri sono una notevole sorgente di ROS, circa l'1-2% dell'ossigeno metabolizzato viene convertito in O₂^{•-} da diversi siti nella catena respiratoria e nella matrice mitocondriale. Altre vie metaboliche specifiche inoltre portano alla formazione di specie reattive dell'azoto (*Reactive Nitrogen Species*, RNS), direttamente implicate nella neurodegenerazione. Infatti, l'O₂^{•-} può reagire con il radicale ossido nitrico (NO[•]) formando agenti ossidanti altamente reattivi, il perossinitrito (ONOO⁻) e il radicale idrossido (OH[•]). Tali specie, oltre a causare danno

ossidativo, inibiscono la funzione mitocondriale inducendo il rilascio di aminoacidi eccitatori come il glutammato e l'aspartato, i quali, a loro volta, provocano un aumento del Ca^{+2} libero nel citosol, portando ad una serie di eventi che scatenano una degenerazione neuronale attraverso:

1. attivazione dell'ossido nitrico sintetasi (Nitric Oxide Synthase, NOS) che genera NO^{\bullet} dall'arginina;
2. attivazione della proteasi che converte la xantina deidrogenasi in xantina ossidasi, la quale a sua volta catalizza l'ossidazione della xantina in acido urico e $\text{O}_2^{-\bullet}$;
3. attivazione della fosfolipasi (PLA2) che rilascia acido arachidonico, il quale si decompone formando l' $\text{O}_2^{-\bullet}$.

Il punto cruciale è il danno provocato dalla NOS neuronale; infatti la formazione del radicale ossido nitrico (NO^{\bullet}) determina:

1. alterazione della funzione mitocondriale;
2. alterazione dell'omeostasi cellulare;
3. danno al DNA e ai lipidi;
4. aumento della concentrazione di Fe libero responsabile del danno ossidativo. Il NO^{\bullet} è assente nella SN, mentre nello striato si ritrova in una popolazione specifica di neuroni con elevata densità. La degenerazione dei neuroni della SNpc è quindi causata da un fattore specifico neurotossico dello striato (Sancesario et al., 2000). L'ossido nitrico può facilmente diffondere attraverso le membrane cellulari ma, a differenza dei più comuni neurotrasmettitori e neuropeptidi, non può essere immagazzinato e riciclato da meccanismi di recupero nei terminali sinaptici. È stato supposto, perciò, che il NO^{\bullet} possa agire senza il bisogno di meccanismi normalmente associati con il rilascio e il recupero degli altri neurotrasmettitori e senza il bisogno di connessioni sinaptiche convenzionali (Garthwaite, 1991).

Per questo, è stata avanzata l'ipotesi che i neuroni contenenti la NOS abbiano caratteristiche morfologiche distintive e siano in grado di creare connessioni sinapitche con altri neuroni. Tecniche di immunocitochimica sui neuroni nitrinergici hanno evidenziato un meccanismo retrogrado secondo cui la NOS funziona da sinapsi terminale fra un terminale eccitatorio glutammanergico e una spina dendritica post-sinaptica dopaminergica, connettendo entrambi i complessi in modo da modulare l'effetto del terminale eccitatorio sulla spina post-sinaptica.

Per valutare lo stato ossidativo dell'organismo si può valutare il danno cellulare tramite misura dei radicali (ROS e RNS) o mediante la determinazione dei metaboliti che si formano durante i processi cui partecipano i radicali; oppure si può verificare la capacità di difesa contro gli agenti ossidanti per mezzo della misura degli antiossidanti naturali (vitamine, acido urico), degli enzimi (GPO, SOD e catalasi) e dei loro substrati (GSH e GSSG).

I radicali causano danno a diversi tipi di molecole biologiche: proteine, lipidi e DNA. Una conseguenza dell'eccessiva produzione dei ROS nel cervello è la perossidazione dei fosfolipidi e acidi grassi polinsaturi liberi. Il danno provoca un'alterazione della struttura e funzione del doppio strato fosfolipidico delle membrane plasmatiche e degli organelli citoplasmatici. Un modo per misurare l'indice di perossidazione lipidica nella SNpc consiste nel valutare i livelli dei prodotti di questo processo. La perossidazione lipidica dell'acido arachidonico legato alle membrane rilascia una serie di aldeidi tra cui la malondialdeide (MDA) e il 4-idrossi-2-nonenale (HNE). Gli elevati livelli di questi metaboliti, riscontrati nella SNpc dei pazienti parkinsoniani, confermano la situazione di intenso stress ossidativo. Inoltre il loro incremento, fino a quattro volte, riscontrato anche

nel fluido cerebrospinale suggerisce un parallelo incremento nel cervello (Dexter et al., 1989; Selley, 2001). È stato anche dimostrato che il HNE e la MDA sono composti elettrofilici in grado di reagire con i residui di His, Lys e Cys provocando, nelle proteine solubili cellulari, l'introduzione di gruppi carbonilici (CO) utili per la valutazione ossidativa (Dalle-Donne et al., 2003). L'elevata produzione di radicali inibisce anche l'attività dei meccanismi di riparo del DNA dei neuroni nigrostriatali dopaminergici. In tal caso è stato osservato che i radicali sono in grado di idrossilare in posizione C-8 i residui guanosinici del DNA, producendo la 8-idrossi-deossiguanosina: ne è stato evidenziato l'incremento in analisi *post-mortem* di pazienti parkinsoniani (Sanchez-Ramos et al., 1994).

1.2. Voltammetria

La voltammetria è una tecnica di analisi basata sulla misura della corrente che passa attraverso un elettrodo immerso in una soluzione contenente specie chimiche elettroattive (che si possono cioè ossidare o ridurre), quando esso è sottoposto ad una variazione di potenziale. L'elettrodo, chiamato elettrodo di lavoro, può essere costituito da materiali di vario tipo e possiede generalmente una superficie molto piccola per poter assumere velocemente il potenziale imposto in modo accurato.

Questa tecnica è molto versatile e, in ambito di ricerca, consente di effettuare studi su molteplici aspetti delle reazioni elettrochimiche, quelle cioè che avvengono con scambi di elettroni tra reagenti e prodotti. Per queste reazioni è possibile studiare le leggi che governano la dipendenza della corrente elettrica dal potenziale imposto all'elettrodo.

L'applicazione delle diverse tecniche voltammetriche é alla base quindi della comprensione delle leggi che regolano vari fenomeni elettrochimici e ha una ricaduta di grande importanza in vari campi tecnologici.

Una delle applicazioni più importanti e diffuse della voltammetria è comunque la determinazione quantitativa e qualitativa di specie chimiche in soluzione che abbiano la possibilità di essere ossidate o ridotte.

Per comprendere il meccanismo su cui si basa la voltammetria supponiamo che un elettrodo di lavoro sia immerso in una soluzione contenente una specie elettroattiva A_{ox} , in grado di ridursi (ovvero di acquisire elettroni dall'elettrodo) in base alla reazione (3):



e che all'elettrodo venga imposto un potenziale nettamente più riducente (ovvero più negativo) del potenziale di riduzione della specie in oggetto.

Affinché avvenga il passaggio di corrente attraverso l'elettrodo é necessario che A_{ox} , partendo dalla soluzione in cui si trova, raggiunga l'elettrodo e che accetti elettroni da quest'ultimo. Questo processo é governato da due fattori cinetici: la velocità con cui la specie chimica arriva all'elettrodo (v_d) e la velocità di scambio degli elettroni tra elettrodo e soluzione (v_e).

I processi che consentono ad una specie chimica di muoversi in una soluzione sono la convezione, la migrazione e la diffusione.

- Convezione

E' un fenomeno indipendente dal processo di scarica e si realizza quando una soluzione é sottoposta ad agitazione, oppure quando in essa si verificano delle disomogeneità, come ad esempio un gradiente di

temperatura o di densità. In questo caso le molecole del solvente e degli analiti si muovono con un moto più o meno turbolento che diventa sempre più laminare, man mano che ci si avvicina alla superficie dell'elettrodo. Lo strato di soluzione a stretto contatto con la superficie dell'elettrodo é invece praticamente stazionario.

- Migrazione

Movimento causato dalla forza di attrazione del campo elettrico generato dall'elettrodo nei confronti di ogni ione di carica opposta e dalla contemporanea forza di repulsione da parte di ogni ione con la stessa carica.

- Diffusione

Movimento spontaneo che si genera in una soluzione da parte di quelle specie chimiche sottoposte ad un gradiente di concentrazione. Durante il processo di scarica la parte di soluzione a stretto contatto con l'elettrodo diventa sempre più povera di A_{ox} , rispetto al resto della soluzione. Il gradiente di concentrazione che scaturisce richiama la specie elettroattiva dalla soluzione lontana verso l'elettrodo. La velocità di diffusione é direttamente proporzionale al gradiente di concentrazione e quindi alla concentrazione della specie elettroattiva.

Dei tre fenomeni descritti in precedenza, solo la diffusione é correlabile alla concentrazione della specie elettroattiva che si scarica, detta anche depolarizzante.

Corrente faradica e corrente capacitiva

La corrente elettrica che attraversa l'elettrodo ha due componenti: la corrente faradica (che obbedisce alle leggi di Faraday, ed é dovuta alla scarica della specie elettroattiva e la corrente capacitiva (dovuta alla formazione di un doppio strato elettrico per la presenza in soluzione

dell'elettrolita di supporto). Tale doppio strato si comporta da condensatore con capacità molto elevata e la corrente capacitiva che ne consegue si somma alla corrente faradica.

La corrente capacitiva costituisce un'interferenza di fondo aspecifica della corrente faradica e, a volte, può risultare superiore a quest'ultima quando il depolarizzante è in concentrazioni molto basse.

Considerando gli aspetti cinetici, quando una specie elettroattiva è sottoposta ad una scansione di potenziali, si può verificare:

1. uno scambio di elettroni tra elettrodo e soluzione più veloce della variazione di potenziale e quindi della velocità di diffusione ($v_s > v_d$). In questo modo il potenziale dell'elettrodo corrisponde in ogni istante a quello previsto dalla legge di Nernst: si è in presenza cioè di una coppia redox rapida o reversibile o, comunque, che non presenta sovratensioni e il processo di scarica all'elettrodo è legato unicamente alla diffusione.

2. una velocità di trasferimento degli elettroni minore della velocità di diffusione ($v_s < v_d$). Il sistema redox, in questo caso è detto lento o irreversibile o è caratterizzato da forti fenomeni di sovratensione: il suo potenziale è infatti "in ritardo" rispetto a quello previsto dalla legge di Nernst.

3. le due velocità sono simili. La coppia redox ha caratteristiche intermedie e il processo di scarica è regolato sia dalla diffusione che dalla velocità di trasferimento degli elettroni.

I costituenti principali di un moderno strumento per le misurazioni voltammetriche sono:

- la cella di misura
- il circuito potenziostatico
- il PC corredato di un software adatto

- Cella elettrochimica

E' costituita da un contenitore di vetro nel quale sono immersi 3 elettrodi: l'elettrodo di lavoro (*working electrode*, WE) costituito da un capillare collegato a un elettrodo solido; l'elettrodo di riferimento (*reference electrode*, RE), normalmente è un elettrodo di Ag/AgCl, KCl saturo; l'elettrodo contatore o elettrodo ausiliario (*auxiliary electrode*, AUX-CE), costituito da un filo di platino inserito in un cilindro di teflon. L'agitazione è realizzata mediante un agitatore magnetico e un'ancoretta magnetica.

- Potenziostato

Permette di imporre la scansione di potenziale programmata tra WE e RE mentre viene misurata la corrente circolante nella cella, tra WE e AUX-CE. Il sistema di gestione è costituito da un software situato in un PC interfacciato tramite una linea seriale al sistema di misura. Questo software ha il compito di inviare al sistema di misura i parametri di una scansione, di controllarne l'esecuzione e gestire i dati di corrente e potenziale ricevuti. In questo studio è stata utilizzata come tecnica voltammetrica l'amperometria potenziale costante (*constant potential amperometry*, CPA).

1.3. 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 alla diffusione secondo il 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 che differiscono per forme e complessità, tuttavia si possono suddividere in 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 in funzione di un concetto chiamato recovery.

Il recovery è il rapporto fra la concentrazione delle sostanze dializzate e la concentrazione delle stesse in un medium di riferimento in cui viene

posizionata la sonda ed è influenzato da diversi fattori quali: il flusso di perfusione, il tempo di campionamento, l'area e 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 (discostamento della diffusione delle molecole da una linea retta).

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, questo è direttamente proporzionale al flusso, normalmente è espresso in grammi. Il recovery relativo è inversamente proporzionale al flusso per unità di tempo, generalmente espresso come percentuale (fig. 2).

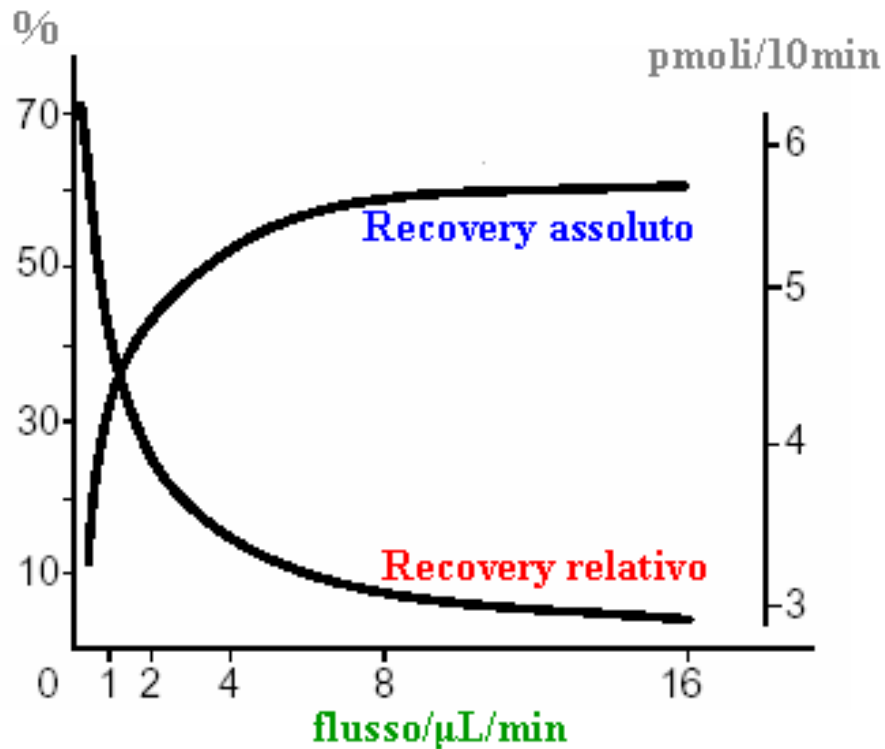


Fig. 2. Rapporto tra recovery assoluto e recovery relativo.

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.

1.4. PC12

La linea cellulare PC12 deriva da un feocromocitoma ed è stata originariamente isolata dalla midollare del surrene di ratto nel 1976 (Greene e Tischler, 1976). Come le cellule cromaffini le PC12 sintetizzano la dopamina (DA) e anche la noradrenalina (NA) che rilasciano in seguito a

depolarizzazione della membrana con un meccanismo Ca^{2+} dipendente (Greene e Rein, 1977).

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, infatti, non sono costose, sono 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 queste oltre a contenere DA (Greene e Rein 1987) possiedono i suoi recettori sulla membrana esterna (Sampath et al. 1994). La presenza della DA, dei suoi recettori e dei meccanismi di re-uptake rende queste cellule paragonabili alle terminazioni dopaminergiche più delle cellule da cui derivano (cellule cromaffini della midollare del surrene) (Fig. 3). Questo concetto è rinforzato dalla presenza della isoforma A delle monoaminoossidasi (MAO) di tipo A, caratteristica propria solo dei neuroni dopaminergici (Finberg e Youdim, 1983) mentre nelle cellule cromaffini della midollare del surrene prevalgono le MAO di tipo B (Youdim, 1991). La linea cellulare PC12 rappresenta quindi un modello per capire la neurotossicità di una serie di composti che agiscono sui neuroni centrali della DA con significative implicazioni per il trattamento dei disordini neurologici. 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.

Mettendo a confronto i neuroni dopaminergici con le cellule PC12 e la cellule da cui derivano (cellule della midollare del surrene), possiamo vedere alcune differenze. L'analisi immunostochimica per la tirosina idrossilasi (TH) mostra un'intensa colorazione in ogni compartimento

cellulare. Nelle cellule PC12 l'immunocolorazione è localizzata nel citoplasma mentre nei neuroni dopaminergici risultano positivi per la colorazione della TH gli assoni. Con l'immunoistochimica per il DAT si ottiene un risultato simile per i tre tipi di cellule prese in esame; tuttavia, il trasportatore della DA (DAT) è meno presente nelle cellule PC12. L'immunoistochimica per il trasportatore vescicolare delle mono-ammine di tipo 2 (VMAT-2) è negativo nelle PC12, mentre la sua presenza è notevole nella midollare del surrene e nello striato. Il modello catecolaminergico delle cellule PC12 è molto simile alle terminazioni dopaminergiche, anche se in queste la catecolamina più abbondante è la DA (nonostante sia 10 volte meno concentrata rispetto a quella presente nei terminali dopaminergici). In questa linea cellulare, la quantità di NA è molto bassa, mentre l'epinefrina (E) non è rilevabile. Inoltre, le PC12 possiedono una notevole quantità di L-DOPA. Questo modello è in netto contrasto con ciò che si osserva nelle cellule della midollare del surrene, dove sono presenti solo E e NE. I livelli di catecolamine sono differenti così come la quantità di vescicole nei tre differenti tipi cellulari. In particolare, la densità di vescicole secretorie è molto bassa nelle cellule PC12. Le vescicole secretorie contenenti NE sono più abbondanti nelle cellule della midollare del surrene e sono altamente concentrate all'interno DA terminali catecolaminergici. Misurando la quantità di metaboliti della DA, si può riscontrare che nelle PC12 sono presenti in concentrazione molto vicine a quelle della DA, mentre sono molto meno abbondanti rispetto ai terminali striatali. Questo dimostra che il rapporto DOPAC /DA e HVA /DA è vicino a 1 per le PC12, mentre è molto basso per i terminali DA striatali. Ciò indica che nelle PC12, nonostante vi sia una minore quantità di DA, vi è un elevato metabolismo a causa di poco efficiente

meccanismo di stoccaggio (Fornai et al., 2007). La presenza di significative quantità di L-DOPA nelle PC12 è inatteso quanto l'attività dell'enzima dopa-decarbossilasi che è in eccesso rispetto all'enzima TH (Kopin, 1985). Quindi, la presenza di L-DOPA nelle PC12 suggerisce che in questa linea cellulare l'attività della dopa-decarbossilasi può limitare un passo nella biosintesi delle catecolamine come si verifica in vivo durante condizioni patologiche (Neff e Hadjicon-stantinou, 1995). Esiste inoltre, nei tre tipi cellulari una notevole differenza di polarizzazione delle vescicole secretorie. In particolare, all'interno delle cellule PC12, i granuli sono più concentrati vicino alla membrana plasmatica rispetto ad altre parti del citoplasma.

Dopo differenziazione con il fattore di crescita nervoso (NGF) le PC12 hanno un fenotipo simile ai neuroni dei gangli simpatici e possono essere coltivate infinitamente. 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 catecolamine 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 esplorato in dettaglio.

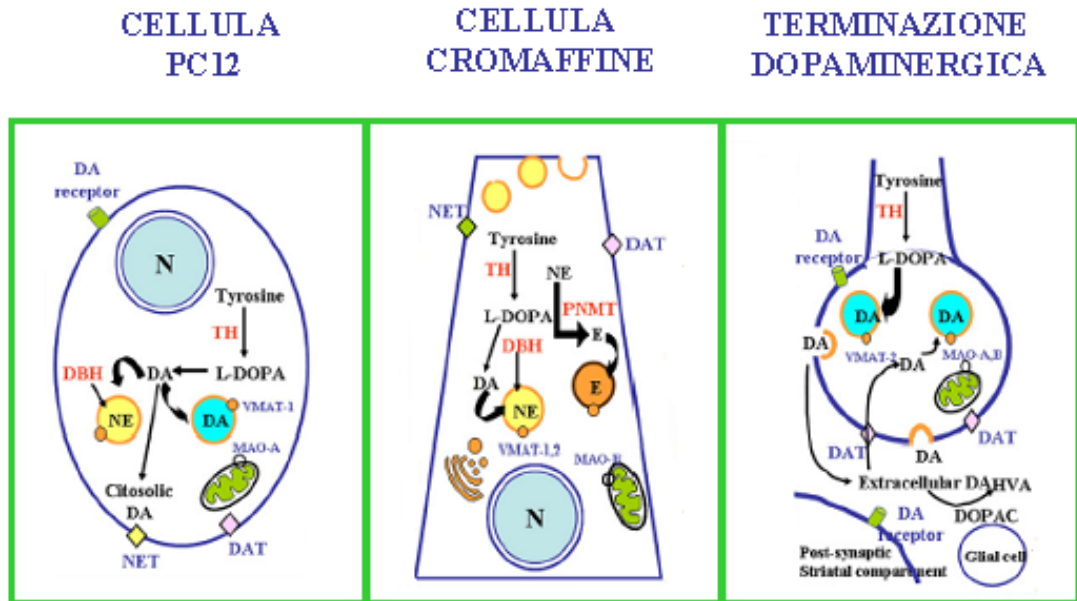


Fig. 3. Rappresentazione schematica di una cellula PC12, una cellula cromaffini della midollare del surrene e una terminazione dopaminergica

1.5. Determinazione elettrochimica della dopamina

La dopamina (DA) (Fig. 4), nota anche come 3,4-diidrossifenetilammina o 3-idrossitiramina, è una catecolamina derivata dalla tirosina attraverso un processo biochimico di idrossilazione ad L-DOPA e successiva decarbossilazione. La DA ha un ruolo importantissimo sia a livello periferico, dove ha un ruolo fondamentale a livello del sistema cardiovascolare e renale, sia nel sistema nervoso centrale (SNC), dove funge da neurotrasmettitore.

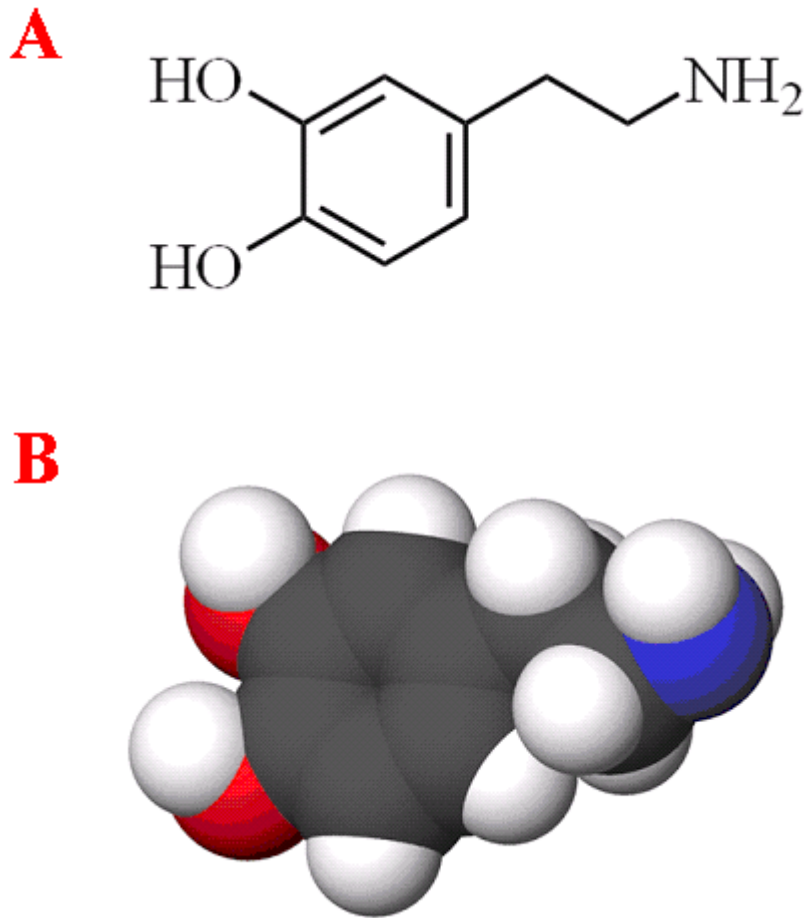
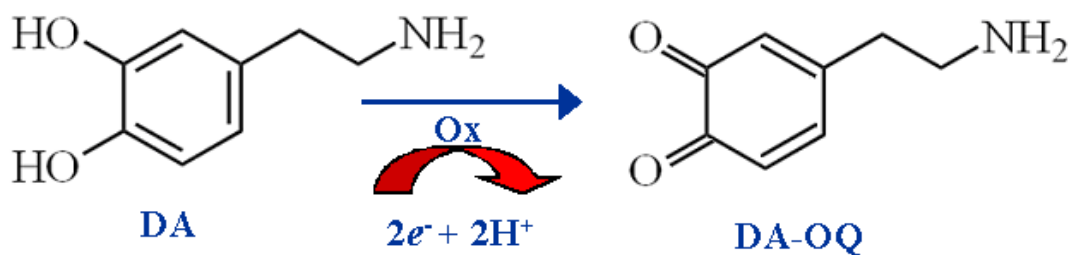


Fig. 4. Formula di struttura della DA (A) e struttura tridimensionale della dopamina

Nel SNC, la DA è implicata nelle funzioni cognitive (O'Neill, 2005) nella via della ricompensa (Wightman e Robinson, 2002) e nel morbo di Parkinson (Rocchitta et al., 2004; Rocchitta et al., 2005a). I processi biochimici della DA sono stati studiati sia *in vivo* che *in vitro* usando diverse tecniche tra le quali la microdialisi (Chiou et al., 2008; 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 come si vede nella seguente reazione:



Questa reazione è possibile tramite l'utilizzo di elettrodi al carbonio ricoperti di Nafion che hanno una buona selettività contro gli anioni elettrochimicamente ossidabili (Joyce et al., 2007; Doherty et al., 1996). 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 è 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 scernere, sintetizzare e metabolizzare la DA (Fornai et al., 2007; Sasakawa et al., 2005; Green et al., 2001). In diversi studi questa linea cellulare è stata utilizzata per comprendere i meccanismi dell'omeostasi dell'ossidazione della DA *in vitro* (Rocchitta et al., 2005-b; Serra et al., 2003-b). Lo scopo di questo studio è di utilizzare un sistema doppio microdialitico-voltammetrico per la detenzione online della DA secreta dalle cellule PC12 (Migheli et al., 2008). Questo sistema deriva da un sistema precedentemente messo a punto (Hebel e Serra; Serra et al., 2007) e permette di effettuare simultaneamente due esperimenti, trattato-

controllo, utilizzando la stessa sospensione cellulare. Piuttosto che 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 ($\sim 10^6$) e di eseguire una comparazione diretta dell'aumento della DA extracellulare rilasciata dalle cellule in un esperimento trattato-controllo.

2. SCOPO DELLA RICERCA

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da una perdita del tono dopaminergico nel compartimento striatale cerebrale. Lo studio *in vitro* della secrezione della dopamina è risultato estremamente utile nel chiarire l'effetto di diversi farmaci senza l'utilizzo di animali da esperimento e si avvale dell'impiego di una grande varietà di tecniche. Lo scopo del presente studio è quello di combinare un sistema modificato per la microdialisi *in vitro* con un nuovo

sistema amperometrico a due canali che permette la quantificazione *on line* della dopamina secreta da cellule PC12. Il sistema sviluppato presenta eccellente sensibilità e stabilità e ben si adatta allo studio della secrezione/release di diversi neurotrasmettitori in cellule neuronali in sospensione grazie alla possibilità di integrazione con differenti microsensori o biosensori.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Reagenti e soluzioni

Tutti i reagenti chimici utilizzati sono stati sciolti in acqua bidistillata deionizzata (Milli-Q). DA, 3-metossitiramina (3-MT), acido didrossifenilacetico (DOPAC), acido omovanillico (HVA), acido urico (UA) e acido ascorbico (AA) sono stati acquistati dalla Sigma (Milano, Italia). La soluzione di Nafion resina perfluorinato (5% in alcol alifatico) è stata acquistata dalla Sigma (Milano, Italia). La soluzione tampone fosfato (PBS) è stata fatta usando NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM,

KH_2PO_4 1.76 mM, glucosio 7.5 mM, CaCl_2 1.19 mM, MgCl_2 0.54 mM. Per gli esperimenti con KCl 75 mM, è stato utilizzato un PBS modificato con KCl 75 mM e NaCl 81 mM. Per gli esperimenti calcium-free è stato fatto un PBS privo di CaCl_2 e al quale è stato aggiunto acido etilenglicoltetraacetico (EGTA 1mM). Tutti i PBS hanno un pH di 7.4. Tutti i sali utilizzati sono stati acquistati dalla Sigma (Milano Italia). Le soluzioni di DA e 3-MT sono state preparate con acqua Milli-Q e utilizzate subito. 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 elettroniche

Le parti elettroniche sono state ottenute 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 -3). La sezione amperometrica del DCP è stata costruita utilizzando sei amplificatori operazionali (National LMC6042), mentre il differenziatore-amplificatore è costituita 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 DPC 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. DPC: disegno e costruzione

Il DPC 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 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). Un potenziostato doppio - OPA controlla il RE e l'elettrodo ausiliario (*auxiliary electrode*, AE). Il convertitore voltaggio - corrente (I/V) è un singolo adattamento di un classico amplificatore (Serra et al, 2007) con un guadagno fisso a seconda del valore di RF1-2 (10 MX). Il AD626 basata sulla differenza amplificatore ha la duplice funzione di rimuovere il potenziale applicato al WE (Rocchitta et al, 2007) e amplificare il segnale di 100 volte (1 NA / V). Il nucleo della parte digitale è un Propeller, un 32 bit multipolare CMOS IC contenente otto controllori indipendenti chiamati

COGs. La MCU, lavora a 80 MHz, controlla la ADC, il DAC, e la trasmissione seriale dei dati al PC. MCU periferiche sono dati indipendenti e linee di controllo per prevenire le collisioni durante l'hardware parallelo computing. Un USB (Universal Serial Bus), a condizione stabilizzata alimentazione del DCP.

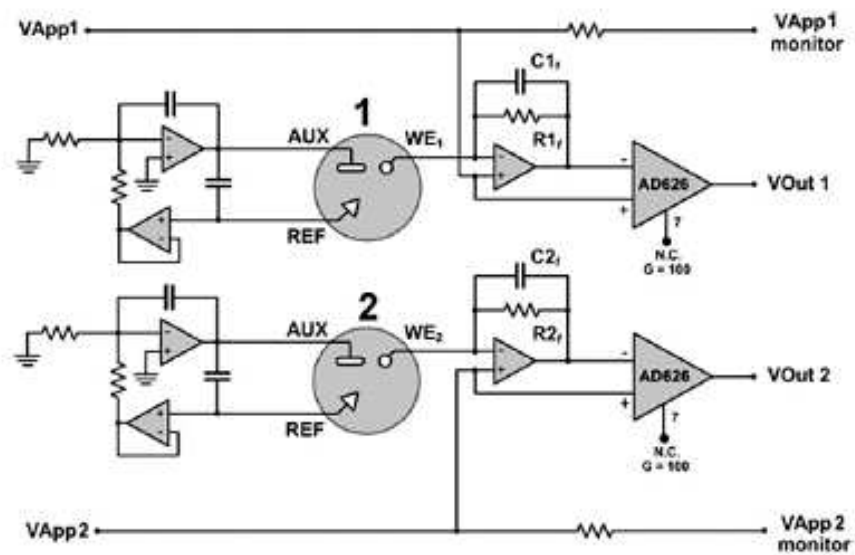


Fig. 5. Rappresentazione schematica del DPC sviluppato e usato in questo studio. Il disegno ha due canali identici che consistono in un potenziostato a due OPA, un convertitore corrente/voltaggio e un differenziatore/amplificatore. Ogni canale controlla una cella elettrochimica completa (1,2) ed è connesso a un outlet del capillare microdialitico. **WE** 1,2, elettrodo di lavoro (microsensore per la DA); **REF**, elettrodo di riferimento (**RE**); **AUX**, elettrodo ausiliario; VApp1,2, 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, e quindi 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; è stato sviluppato in Visual Basic.NET 2008 utilizzando la libreria grafica ZedGraph.

3.5. Microsensore per la DA e cella elettrochimica *flow-trough*

Il rivestimento di Nafion del WE (microsensore per la DA) sono stati realizzati usando dei fili di argento rivestiti in Teflon (30 mm in lunghezza, $\varnothing = 250 \mu\text{m}$, Advent Research Materials, Suffolk, UK). Approssimativamente 1 mm di questo filo di argento è stato esposto rimuovendo lo strato esterno di Teflon ed inserito in una micropipetta di

vetro riempita in parte con colla epossidica caricata al carbone (55%, w/w) (Araldite-M, Sigma–Aldrich). Il disco di carbonio dell'elettrodo così ottenuto ha un'area di 0.0019 cm² e un diametro di 500 µm è stato costruito miscelando 850 mg di grafite (polvere di grafite sintetica, particolato Ø 20 µm (Sigma–Aldrich) con 500 mg di araldite-m e 200 mg di indurente (Ramírez-García et al., 2002) riempiendo una porzione (10 mm) di una micropipetta di vetro (microcaps, Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) con questa mistura. Il filo d'argento garantisce un buon contatto elettrico. Dopo aver lasciato il WE per 24h a 40°C il disco è stato lucidato usando la carta vetrata (1200 grani) e polvere di diamante ed è stato rivestito con Nafion (immergendolo per 3 volte nella soluzione alcolica al 5%) e lasciati asciugare per 20' a 120°C. Il potenziale di ossidazione della DA è stato fissato sperimentalmente a + 250 mV (vs Ag/AgCl) usando la voltammetria ciclica a 100mV/s (CV37 voltammograph, Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN,USA). Gli elettrodi per la DA sono stati calibrati in condizioni di quiescenza aggiungendo volumi noti di una soluzione standard di DA ad una soluzione di PBS. Sono stati utilizzati solo gli elettrodi con un *detection limit* per la DA < 25 nM e un'alta selettività contro l'AA con un rapporto DA/AA di 1000:1. Esponendo i sensori ad altri anioni ossidabili quali UA, DOPAC e HVA a concentrazioni compatibili con quelle presenti negli spazi extracellulari della coltura di PC12 (> 5 µM) non sono state osservate significative interferenze. L'elettrodo di riferimento (RE) e l'elettrodo ausiliario-contatore (AUX-CE) usati nella cella elettrochimica sotto 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. L'elettrodo di riferimento è stato preparato immergendo 1 mm del filo d'argento (Ø 125

μm) in una soluzione saturata di KCl e applicando + 500 mV per 1 min. Il WE, RE e CE sono stati incollati insieme usando la resina epossidica e saldati ad un connettore da 2.54 mm. Il F-TEC è stato assemblato usando una porzione di micropipetta Hamilton da 10 μl (porzione inlet) e una provetta da microcentrifuga da 250 μl (Alpha Laboratories, Eastleigh, UK) (porzione outlet). Le due porzioni inlet e outlet sono connesse a un tubo di polietilene di 25 mm (0.58 mm i.d., Portex, Hythe, UK). Il volume finale della F-TEC è approssimativamente di 10 μl . Per ogni sistema a due canali sono stati selezionati e utilizzati due F-TEC con una risposta simile per la DA.

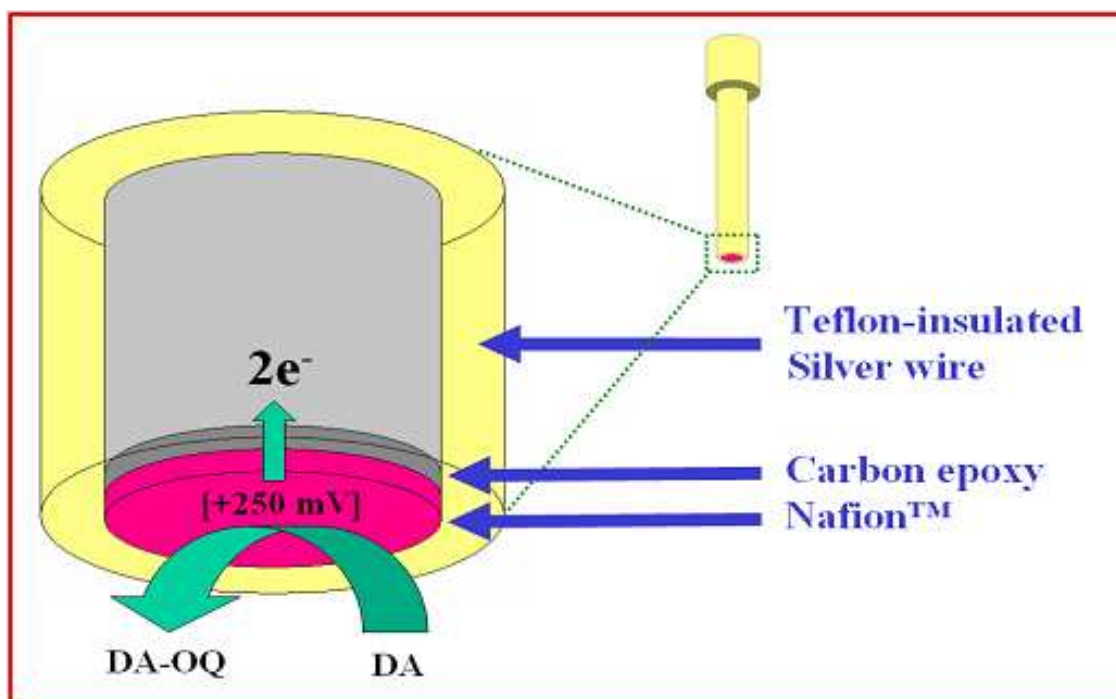


Fig. 6. Disegno schematico dell'elettrodo di lavoro (WE) del microsensore per la quantificazione della DA. La reazione di ossidazione della DA nel corrispondente ortoquinone (DA-OQ) avviene sul disco di carbonio dell'elettrodo (area di 0.0019 cm^2 , $\text{Ø } 500 \text{ }\mu\text{m}$) ricoperto di Nafion, applicando un potenziale di + 250 mV.

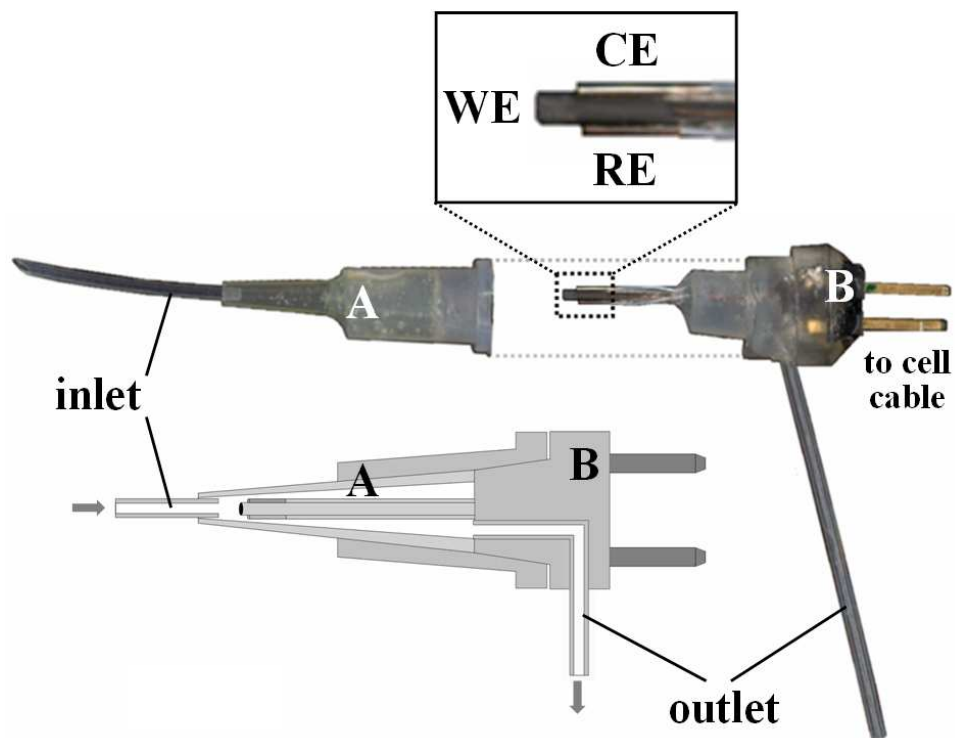


Fig. 7 Disegno schematico della F-TEC sviluppato e usato in questo studio. La cella è composta da una sezione inlet (A) e da una sezione outlet (B) connessa a un canale del potenziostato. WE, elettrodo di lavoro (microsensore per la DA); RE, elettrodo di riferimento; CE (AUX), elettrodo contatore (ausiliario).

3.6. 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., 2005b). La sonda da microdialisi è stata costruita usando due porzioni di tubo di silicone ricoperti 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 silicone 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 silicone 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.

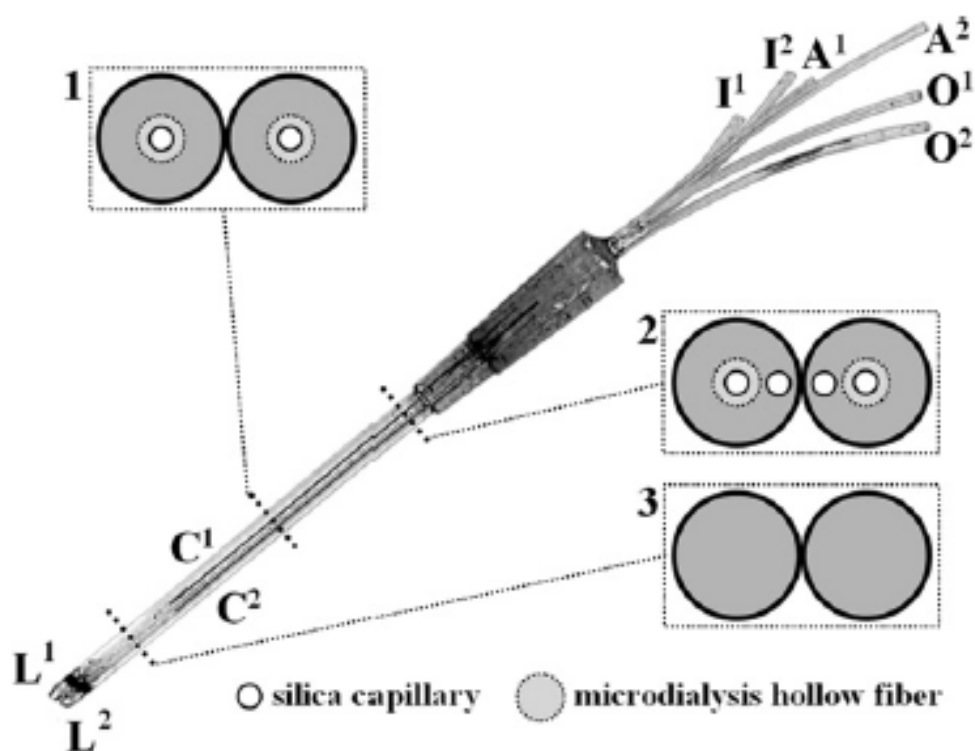


Fig. 8. Disegno schematico di tre sezioni (1-3) del capillare microdialitico a due canali usato in questo studio. C^{1,2}, capillari microdialitici; I^{1,2}, tubi inlet; O^{1,2}, tubi outlet; A^{1,2}, tubi di aspirazione; L^{1,2}, estremità per l'aspirazione della sospensione cellulare.

3.7. Drug reservoir e fluid mixer

È stata costruita una 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). La DR è attraversata da un flusso di perfusione che la connette direttamente al capillare microdialitico, mentre un circuito ausiliario permette un ricambio del contenuto della DR avente funzione di iniettore. Gli inlet e gli outlet della 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 della DR con una soluzione contenente il farmaco e assicura un impatto minimo sulla microfluidica del tubo da microdialisi. Il miscelatore di flusso è stato fatto 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 microdialisi. Per ogni sistema a due canali sono costruiti due DR e due FM.

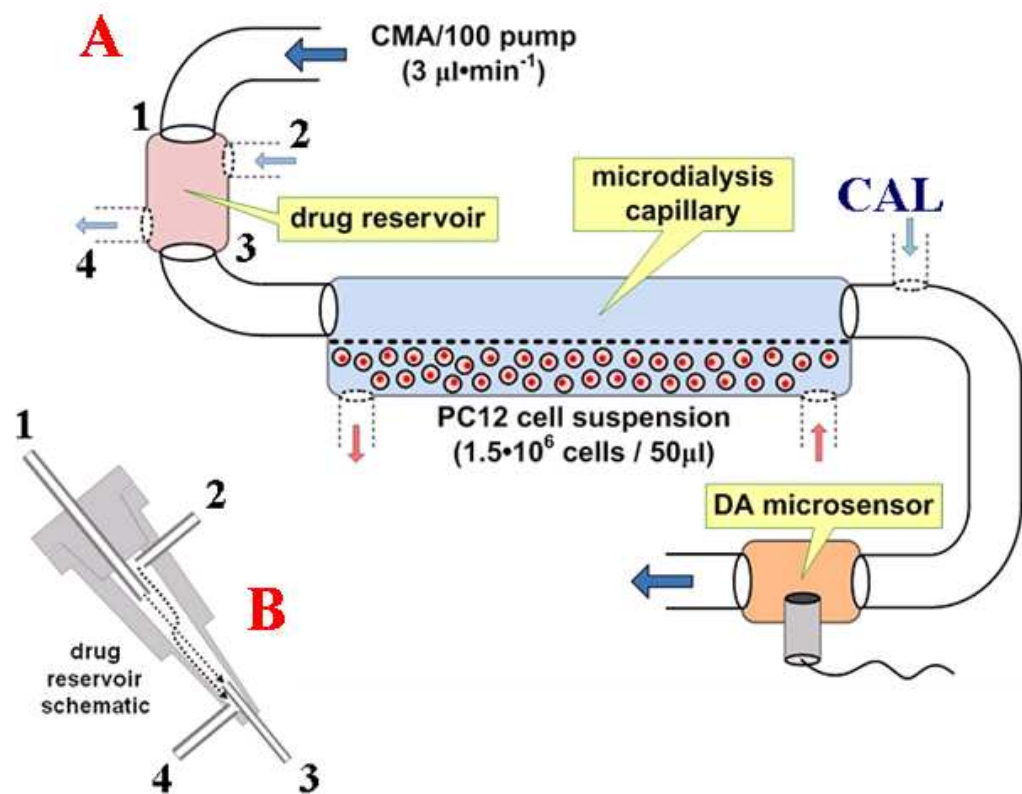


Fig. 9. Schema del singolo canale del sistema microfluidico usato in questo studio (A). Una micropompa peristaltica eroga una soluzione a base di PBS nel capillare microdialitico attraverso una drug reservoir (B) (1→3) all'interno della quale viene caricato il farmaco (2→4). Le PC12 sono aspirate nella camera microdialitica. Una cella elettrochimica completa, che include il microsensor per la DA, è connessa a valle del circuito per il monitoraggio online della DA secreta dalle cellule PC12. La calibrazione diretta del microsensor per la DA è effettuato tramite l'ingresso CAL.

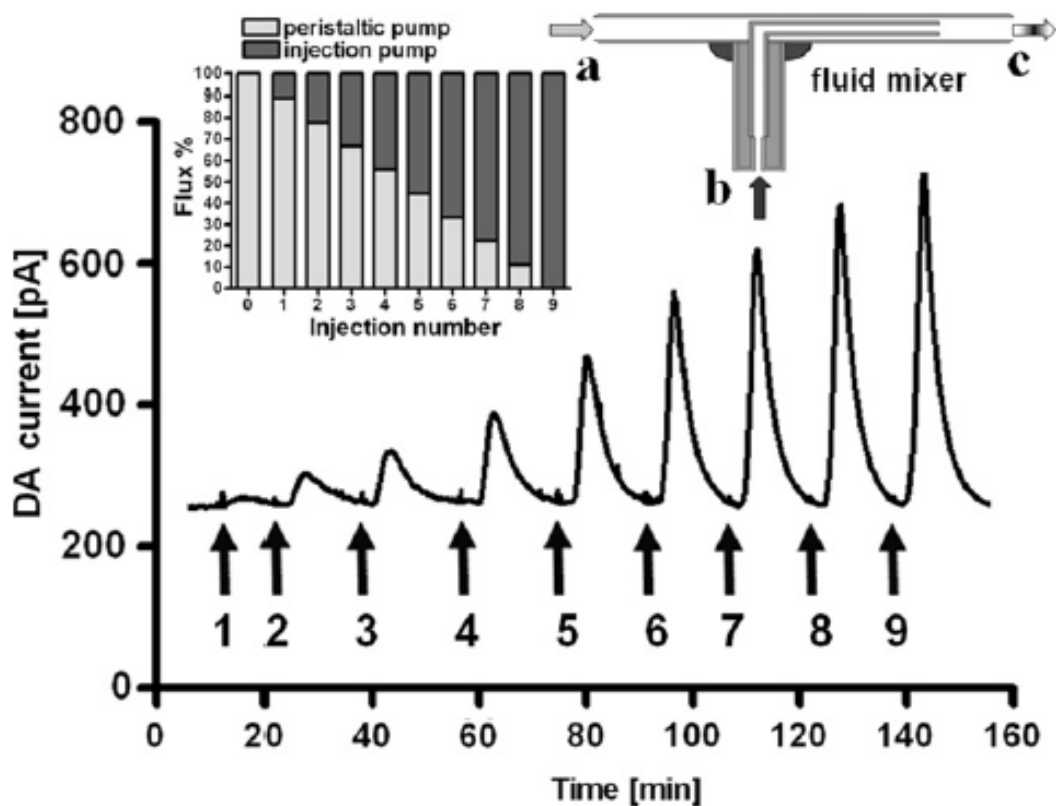


Fig. 10. Calibrazione dinamica del microsensore per la DA effettuata attraverso il capillare microdialitico. Una micropompa peristaltica e una pompa ad iniezione caricata con DA 1 μM in PBS, sono direttamente connesse alla F-TEC usando un fluid mixer (FM) miniaturizzato. La calibrazione è stata fatta con nove iniezioni di DA a distanza di 2 min l'una dall'altra. Prima della calibrazione e tra le varie iniezioni di DA viene attivata solo la pompa microperistaltica, ad un flusso di 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Come si vede nell'istogramma in alto a sinistra, durante le iniezioni di DA (frecche da 1 a 9), il flusso in c è mantenuto fisso a 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ (100%, FM, c). Diminuendo il flusso della pompa microperistaltica ($-0.333 \mu\text{l}/\text{min}/\text{injection}$, FM, a) e aumentando il flusso della pompa da microiniezione ($+0.333 \mu\text{l}/\text{min}/\text{iniezione}$, FM, b) si ha un aumento della concentrazione di DA di $+0.111 \mu\text{M}/\text{iniezione}$.

3.8. 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 Ca²⁺ (1.2 mM), Mg²⁺ (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 94g per 5' e il volume iniziale viene aggiustato in maniera tale da avere una concentrazione finale di cellule compresa tra 2.5 x 10⁵ e 1.5 x 10⁶ / 50 µl.

3.9. Procedura degli esperimenti

Dopo che il sistema sperimentale viene assemblato (Fig. 9), 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 (Fig. 9). 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 μ l/min. I canali della pompa sono connessi agli inlet tramite un lungo tubo di polietilene. Ognuna delle due camere microdialitiche (C1 e C2 nella Fig. 8) viene quindi caricata con 50 μ l di sospensione di cellule PC12 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. La DR viene poi caricata con KCl 75 mM dopo 120' dal caricamento delle cellule.

3.10. Analisi cromatografia del dializzato della sospensione delle cellule PC12

La DA viene quantificata nel dializzato ottenuto dall'esperimento scelto 1.5 x 10⁶ cellule tramite l'HPLC-EC (Rocchitta et al., 2005b; Serra et al., 2003a; serra et al., 2005b; Migheli et al., 1999) usando una pompa Alltech 426 HPLC (Alltech, Sedriano, Italia) allestita con un iniettore Rheodyne (modello 7725, Rohnert Park, CA, USA), una colonna (15 cm x 4.6 mm i.d., ODS80TM C18, Toso Haas, Stuttgart, Germania), un misuratore 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 acido citrico (0.1 M), acido etilene-diaminotetraacetico (EDTA, 1.0 mM), MeOH (8.7%) e sodio octilsolfato (48mg/L) con una velocità di flusso pari a 1.2 ml/ min e un pH 2.9.

3.11. 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 e 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.

3.12. Analisi statistica

La corrente di ossidazione della DA è espressa in picoampere (pA) ed è data dalla media \pm errore standard, 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 e dinamica del microsensore per la DA

Tutte le calibrazioni *in vitro* del microsensore per la DA sono state effettuate a 37°C e dopo 24h dalla costruzione della 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 DPC all'outlet della F-TEC comprendente un microsensore per la DA, un elettrodo contatore (ausiliario) ed elettrodo di riferimento (Fig. 7B). 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 il F-TEC è stato immerso in un beacker 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 note di DA, è stato utilizzato un'ancoretta magnetica di 32mm di diametro; 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 dato un'eccellente linearità con una pendenza di $643 \pm 17 \text{ pA } \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.997$, $n = 6$). Dopo 6 giorni la sensibilità del microsensore decrebbe a $425 \pm 56 \text{ pA } \mu\text{M}^{-1}$ mantenendo comunque una buona linearità ($r^2 = 0.986$, $n = 6$). LA calibrazione dinamica del microsensore della DA (Fig. 10) 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 MF. La retta di regressione è stata calcolata usando l'altezza del picco della DA come valore di corrente (dopo ogni iniezione di DA) ottenendo

sensibilità di $553 \pm 21 \text{ pA } \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.989$, $n = 6$) e $364 \pm 46 \text{ pA } \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.997$, $n = 6$) ottenute rispettivamente dopo 1 giorno e dopo 7 giorni dalla costruzione della F-TEC. Per una descrizione dettagliata della calibrazione dinamica della DA guardare la Fig. 10.

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

In una prima serie di esperimenti effettuati 1 giorno dopo la costruzione della F-TEC, una soluzione di PBS, contenente diverse concentrazioni di DA, è stata caricata nella camera microdialitica simulando un'aspirazione di cellule PC12. Le concentrazioni di DA aspirate nella camera microdialitica furono: 250 nM, 500 nM, 1000 nM (Fig. 11A). La retta di regressione è stata calcolata usando l'altezza del picco della DA come valore di corrente dopo ogni aspirazione di DA; i valori di corrente ottenuti mostrarono una sensibilità di $464 \pm 44 \text{ pA } \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.982$, $n = 6$). In una seconda serie di esperimenti sono stati eseguiti tre caricamenti della camera microdialitica con una soluzione di PBS contenente una soluzione di DA 250 nM utilizzando 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. 11B). Il flusso di perfusione è stato cambiato prima di ogni aspirazione di DA risultando in una variazione dell'altezza del picco di DA. È stata quindi calcolata la retta di regressione e la sensibilità per la DA risultò diminuire di $29 \pm 9 \text{ pA}$ ($r^2 = 0.906$, $n = 6$) per ogni microlitro/minuto di incremento del flusso di perfusione. Per eseguire gli esperimenti con le cellule PC12 è stato scelto un flusso di 3 $\mu\text{l}/\text{min}$, considerato ottimale in funzione della quantificazione elettrochimica della DA in F-TEC.

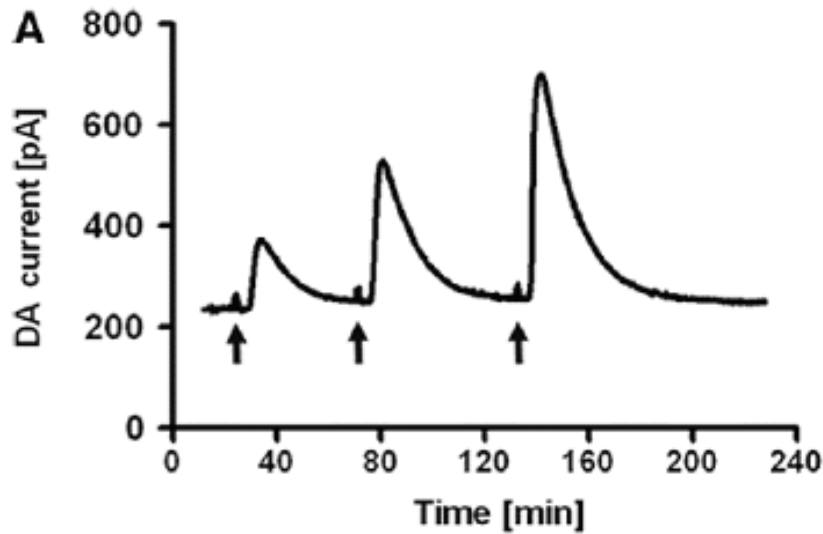


Fig. 11A. Corrente di DA dopo una serie di tre caricamenti consecutivi di una soluzione di PBS contenente differenti concentrazioni di DA (250, 500, e 1000 nM) ad un flusso di perfusione di (3 $\mu\text{l}/\text{min}$). L'aspirazione nel capillare microdialitico viene eseguita come descritto per il caricamento delle cellule PC12 (vedi testo) usando una siringa Hamilton da 1 ml.

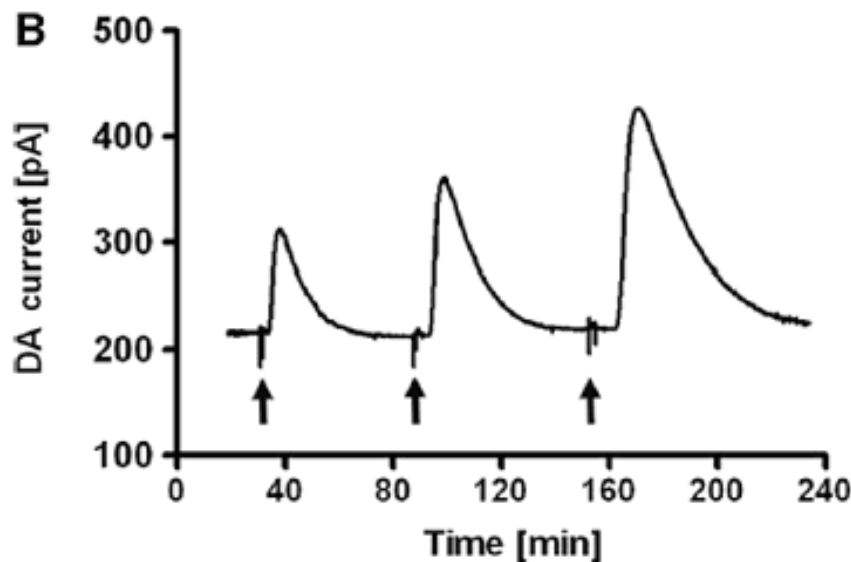


Fig. 11B. Corrente di DA registrata dopo un caricamento di PBS contenente una concentrazione fissa di DA (250 nM) a differenti flussi di perfusione (6, 3, e 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$). L'aspirazione nel capillare microdialitico è fatta come descritto per il caricamento delle cellule PC12 (vedi testo) usando una siringa Hamilton da 1 ml.

4.3. Effetto del numero delle PC12 sul rilascio di DA

Dopo tre caricamenti di DA e l'analisi della regressione lineare, la camera microdialitica venne lavata con acqua bidistillata e le PC12 furono caricate mediante aspirazione nel capillare microdialitico come è già stato descritto nella sezione Materiali e Metodi (1 in Fig. 12A). Diversi esperimenti sono stati condotti effettuando caricamenti di concentrazioni crescenti di PC12 varianti da 2.5×10^5 a 1.5×10^6 cellule. Un picco di DA (Fig. 12A) comparve circa 7 min dopo il caricamento con una concentrazione (ΔC_L) calcolata proporzionale al numero di cellule presenti nella sospensione cellulare. Il ΔC_L è stato determinato dopo ogni esperimento usando un'equazione lineare ottenuta dai tre caricamenti di DA in cella precedentemente descritti, quindi è plottata verso il numero di cellule PC12 (Fig. 12B). 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 risultata una sensibilità di 0.754 ± 0.033 pM (5.76 ± 0.25 fg) per ogni singola PC12 caricata nella camera microdialitica ($r^2 = 0.992$, $n = 6$). Non sono state evidenziate differenze nella ΔC_L in esperimenti con presenza o assenza di Ca^{2+} nel liquido di perfusione. L'analisi cromatografica del dializzato ha inoltre evidenziato una concentrazione massima iniziale di DA pari a 1.188 ± 0.037 μ M / 1.5×10^6 cellule e 0.136 ± 0.023 μ M / 1.5×10^6 cellule 120 min dopo il caricamento, confermando dei risultati già ottenuti usando la microdialisi *in vitro* (Serra et al., 2003a).

4.4. Effetto del KCl sulla secrezione di DA in presenza o meno di Ca²⁺ 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 CaCl₂. Il KCl (75 mM) è stato iniettato in entrambe le DR (2 in Fig. 12A) 90 min dopo il caricamento delle cellule. Un picco di secrezione di DA apparve dopo circa 8 min l'iniezione di KCl ma solo in presenza di Ca²⁺ extracellulare (Fig. 12A). Tale picco di DA, definito come ΔC_{KCl} , è risultato essere proporzionale al numero di cellule, al KCl iniettato e al CaCl₂ extracellulare (dati non riportati). Il ΔC_{KCl} è stata plottato verso il numero di cellule (Fig. 12B) e la retta di regressione è stata calcolata e la concentrazione risultante di DA fu di 0.88 ± 0.04 pM (6.7 ± 0.3 fg) per singola PC12 presente nella camera microdialitica ($r^2 = 0.991$, $n = 3$). L'analisi del dializzato con l'HPLC ha confermato un incremento massimo della concentrazione di DA di 1.269 ± 0.044 μ M / 1.5×10^6 cellule 40 min dopo l'iniezione di KCl compatibile con i risultati precedentemente pubblicati (Serra et al., 2003a). Usando il coefficiente di correlazione di Pearson è stata trovata una significativa correlazione tra i valori medi di ΔC_L e ΔC_{KCl} ($r = 0,9953$, $r^2 = 0.991$, $p < 0,0001$, $xy = 6$). La secrezione di DA evocata da K⁺ non è stata osservata in assenza di Ca²⁺ extracellulare (Fig. 12A).

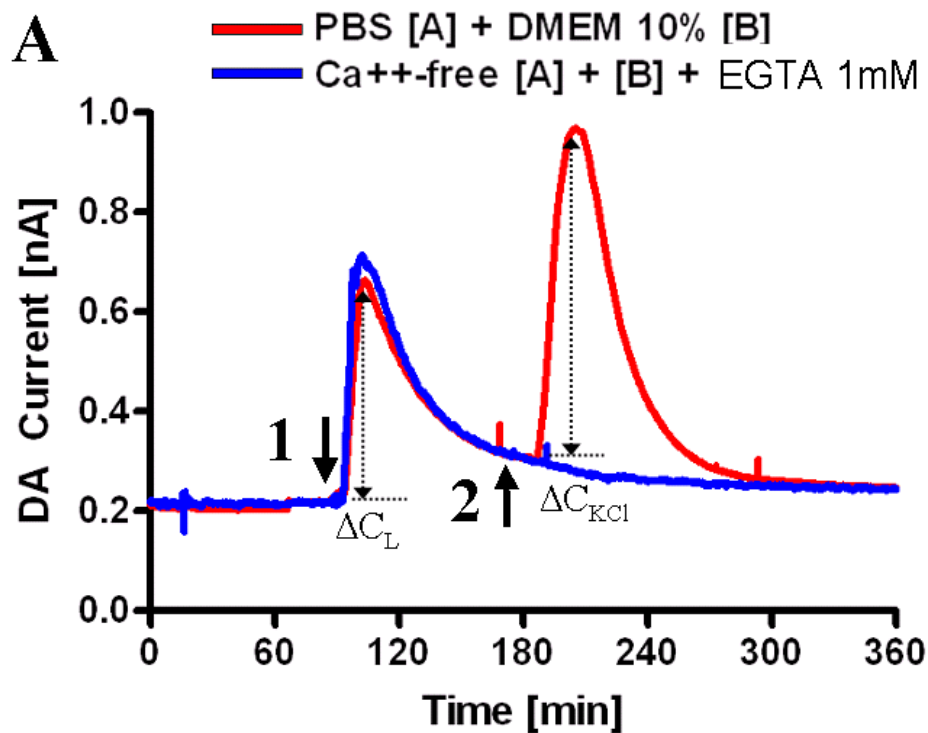


Fig. 12A. Variazioni di DA per 1.5×10^6 PC12 cellule caricate (ΔC_L , 1) e iniezione di KCl (75 mM) (ΔC_{KCl} , 2) registrate simultaneamente con fluido di perfusione normale e Ca²⁺- free (rispettivamente curva rossa e curva blu).

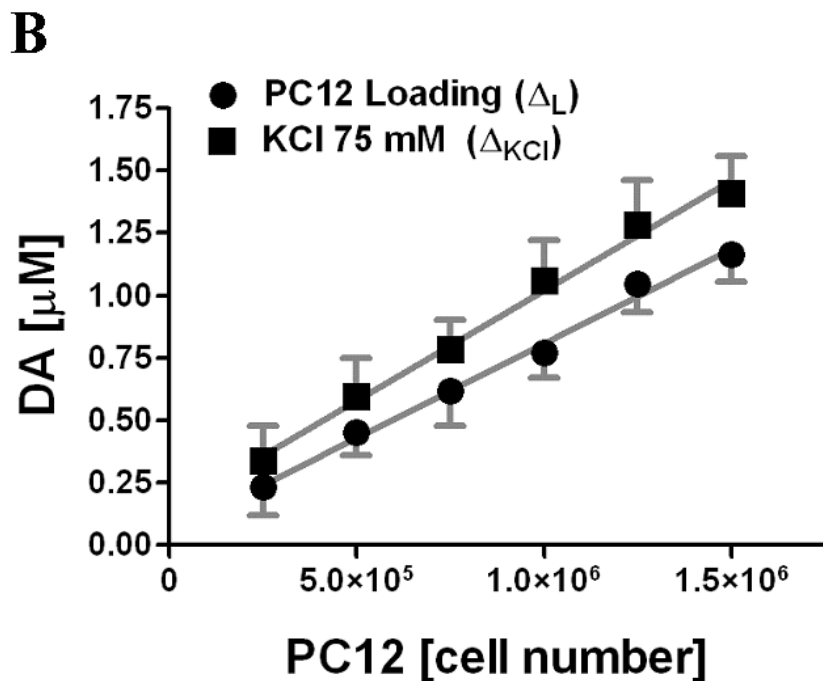


Fig. 12B. ΔC_L e ΔC_{KCl} plottati verso il numero di cellule PC12 (n = 3 per ogni numero di cellule) (vedi testo).

4.5. 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 Tripan 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. 13A). Dopo la fine degli esperimenti di microdialisi le cellule si trovano riaggregate in grandi cluster (Fig. 13B), tuttavia non è stata osservata una significativa diminuzione della vitalità cellulare (vitalità finale è stato $96.2 \pm 3.4\%$, $p < 0.05$, $n = 32$).

5. DISCUSSIONE

5.1. Microelettronica e caratteristiche elettrochimiche del microsensore per la DA

Il modulo amperometrico del DPC è stato ottimizzato per il funzionamento in alimentazione singola (*single supply*), 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 Fig.1, fissando il valore di R_f a $10\text{M}\Omega$, un differenziatore/amplificatore di precisione (AD626) controlla il fattore di amplificazione (1nA/V). In questo modo abbiamo superato le limitazioni del progetto precedente (Rocchitta et al., 2007) relative alle intrinseche variazioni 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 H_2O_2 (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 (dati non riportati). Rispetto ai valori iniziali (giorno 1) è stato 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 stato 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 differenze 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 1 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 al 1° 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 del WE.

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 differenti concentrazioni di DA 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 e 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 *clearance* della DA dal sistema (dati non riportati). La DA ha quindi raggiunto un livello stazionario con una concentrazione al di sotto $0.15 \mu\text{M}/1.5 \times 10^6$ 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 PC12 numero di cellule. Sulla base delle suddette osservazioni, ΔC_L e ΔC_{KCl} potrebbero essere utilizzati per calcolare il numero di cellule PC12 caricato nel capillare microdialitico. Questi risultati 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 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 1 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, relativo 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

Non è stata osservata una significativa diminuzione della vitalità cellulare alla fine degli esperimenti, come riportato nei Risultati. Negli esperimenti di controllo selezionati le cellule PC12 sono state lasciate nella camera microdialitica per più di 12h in condizioni di perfusione standard (3µl/min) senza una significativa diminuzione della vitalità cellulare. Solo dopo 24h la vitalità era ridotta al di sotto del 95%.

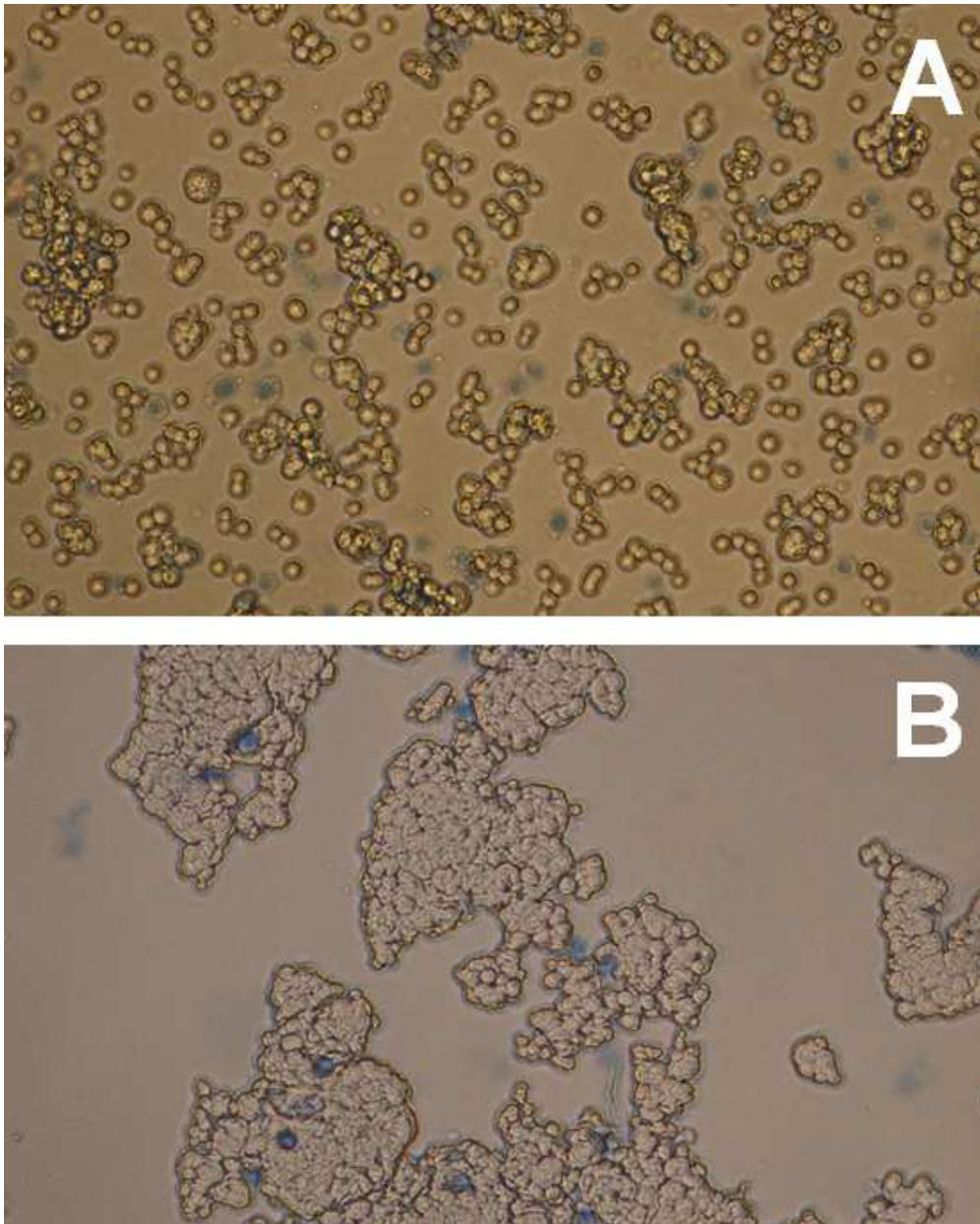


Fig. 13. Microfotografia delle cellule PC12 prima (**A**) e dopo (**B**) il caricamento nel capillare microdialitico (perfuso con 75 mM KCl). Le cellule PC12 sono aspirate delicatamente nel capillare in piccoli cluster o single cells (**A**) usando una siringa Hamilton da 1 ml. Alla fine degli esperimenti le PC12 si trovano aggregate in grandi cluster. Non è stata comunque osservata una diminuzione della vitalità (96%).

6. CONCLUSIONI

Nel presente studio abbiamo sviluppato un doppio sistema microdialitico *in vitro* accoppiato a microsensori per la determinazione dinamica della DA secreta dalle cellule PC12. E' stato validato un protocollo sperimentale trattato-controllo per rilevare la secrezione di DA indotta da K^+ . 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 sensore per la DA potrebbe essere facilmente sostituito con diversi microsensori o biosensori che consentono il rilevamento *in vitro* di altre molecole interessanti, come il nitrossido, il glutammato, il glucosio, e il lattato. L'ulteriore miniaturizzazione dell'elettronica e l'integrazione con pompe peristaltiche ultra miniaturizzate potrebbe consentire la realizzazione di un sistema a basso costo per un rapido screening *in vitro* dei farmaci.

7. RIASSUNTO

Un nuovo sistema *in vitro* a due canali, derivato da un modello precedentemente descritto, è stato accoppiato ai microsensori per la DA per la detenzione sotto-flusso della DA secreta dalle cellule PC12.

Il disegno include due capillari microdialitici indipendenti caricati con una soluzione contenente cellule PC12 costantemente perfuse con un buffer fisiologico (PBS) addizionato con il 10% di D-MEM/F12. Un capillare è perfuso con PBS normale mentre l'altro capillare è perfuso con PBS privo di Ca^{2+} e con aggiunta di un chelante per lo stesso (EGTA). Dopo un primo periodo di stabilizzazione nel quale viene registrata la linea di base, viene perfuso in entrambi i capillari KCl 75 mM. In questo modo si ottiene contemporaneamente un esperimento trattato-controllo che permette di quantificare il rilascio di DA Ca^{2+} dipendente evocata dal K^+ . In questo lavoro abbiamo ideato, costruito e caratterizzato il microsensore per la DA. Il circuito elettronico deriva da un disegno precedentemente pubblicato ed è stato ottimizzato per l'amperometria a potenziale costante a due canali. Il sistema di microdialisi è stato caratterizzato *in vitro* in condizioni sperimentali differenti. La concentrazione di DA secreta dalle cellule PC12 è stata confermata dall'HPLC-EC. La vitalità delle PC12 è stata verificata prima e dopo ogni esperimento ed è risultata essere sempre al di sopra del 95%.

Il sistema proposto ci permette di testare differenti farmaci, che agiscono sulla secrezione di DA, sulle cellule PC12 in un esperimento trattato-controllo a partire dalla stessa sospensione cellulare.

8. BIBLIOGRAFIA

Sonia Dedola, Sviluppo di un nuovo sistema voltammetrico microdialitico per lo studio delle variazioni neurochimiche in cellule neuronali in coltura, Dottorato di ricerca in Neuroscienze XXI ciclo, Università degli studi di Sassari

- Baron J.A.** Cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology* 36 (1986) 1490–1496.
- Ben Shachar D.**, Riederer P., Youdim M.B.H. Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implication for PD. *J. Neurochem.* 57 (1991) 1609–1614.
- Benveniste H.**, Hansen A.J., Ottosen N.S., Determination of brain interstitial concentrations by microdialysis. *J. Neurochem.* 52 (1989) 1741–1750.
- Betarbert R.**, Sherer T. B., MacKanzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V., Greenamyre, T., Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3 (2000) 1301–1306.
- Bonifati V.**, Rizzu P., Van Baren M.J., Schaap O., Breedveld G. J., Krieger E., Dekker M. C., Squitieri F., Ibanez P., Joosse M., van Dongen J.W., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., Meco G., van Duijn C.M., Oostra B.A., Heutink P., Mutations in the DJ1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299 (2003) 256–259.
- 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.
- Chung, K.K.**, Dawson V. L., and Dawson T. M., The role of the ubiquitin-proteosomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 24 (2001) 7–14.
- Coupland R.E.**, Determining sizes and distribution of sizes of spherical bodies such as chromaffin granules in tissue sections. *Nature* 217 (1968) 384–388.
- Dalle-Donne I.**, Rossi R., Giustarini D, Milzani A., Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* 329 (2003) 23–38.
- 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 meripidine analogues. *Psych. Res.* 1 (1979) 249–254.

- Dev K.K.**, Hofele K., Barbieri S., Buchman V.L., Van der Putten H., Part II: α -synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 45 (2003) 14–44.
- Dexter D.T.**, Carter C.J., Wells F.R., Lees A.J., Agid F., Agid Y., Jenner P., Marsden C.D. Basal lipid peroxidation in substantia nigra increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52 (1989) 381–389.
- Di Ilio C.**, Sacchetta P., Angelucci S., Bucciarelli T., Pennelli A, Mazzetti AP. Interaction of glutathione transferase Pl-1 with captan and captofol. *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996) 43–48.
- 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., 1983. Selective MAO A and B inhibitors: their mechanism of action and pharmacology. *Neuropharmacology* 22 (1983) 441–446.
- Farrer M.**, Kachergus J., Forno L., Lincoln S., Wang D.S., Hulihan M., Maraganore, D., Gwinn-Hardy K., Wszolek Z., Dickson D., Langston J. W., Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann. Neurol.* 55 (2004) 174–179.
- Ebadi M.**, Govitrapong P., Sharma S., Muralikrishnan D., Shavali S., Pellet L., Schafer R., Albano C., Eken J. Ubiquinone (Coenzyme Q10) and the mitochondria in oxidative stress of Parkinson's disease. *Biol. Signals Recept* 10 (2001) 224–253.
- Feany M.B.**, Bender W.W., A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 404 (2000) 394–398.
- 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.
- Fornai F.**, Schluter O. M., Lenzi P., Gesi M., Ruffoli R., Ferrucc, M., Lazzeri G., Busceti C. L., Pontarelli F., Battaglia G., Pellegrini A., Nicoletti F., Ruggieri S., Paparelli A., and Sudhof, T. C., Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP

infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 3413–3418.

Fornai F., Lenzi P., Gesi M., Ferrucci M., Lazzeri G., Busceti C.L., Ruffoli R., Soldani P., Ruggieri S., Alessandrì M. G., Paparelli A. Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition, *J. Neurosci.* 23 (2003) 8955–8956.

Fornai F., Lenzi P., Lazzeri G., Ferrucci M., Fulceri F., Giorgi 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.

Forno L., Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55 (1996) 259–272.

Forno L. S., DeLanney L. E., Irwin I., and Langston J. W. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv. Neurol.* 60 (1993) 600–608.

Forno L. S., Langston J. W., DeLanney L. E., Irwin I., Ricaurte G. A. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol.* 20 (1986) 449–455.

Greenamyre J. T., Betarbet R., Sherer T., The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria, *Park. Rel. Disord.* 9 (2003) 59–64.

Greenamyre J.T., Hastings, T. G., 2004, Parkinson's-divergent causes, convergent mechanisms. *Science* 304 (2004) 1158–1160.

Gordito M.P., Kotsis D.H, Minter 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.

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., Tischler A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma 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.

Hoglinger G.U., Feger J., Prigent A., Michel P. P., Parain, K., Champy P., Ruberg M., Oertel W.H., Hirsch E.C., Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J. Neurochem.* 84 (2003) 491–502.

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.

Jiménez-Jiménez F.J., Mateo D., Gimenez-Roldàn S. Exposure to well water and pesticides in Parkinson's disease: a case control study in the Madrid area. *Movement Disord.* 7 (1992) 149–152.

Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14 (1991) 60–67.

Gassner B., Wuthrich A., Scholtysik G., Solioz M. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 28 (1997) 855–860.

Gorell J.M., Jhonson C.C., Rybicki B.A., Peterson E.L., Richardson R.J. The risk of Parkinson's disease with exposure to the pesticides, farming, well water and rural living. *Neurology* 50 (1998) 1346–1350.

Gorell J.M., Johnson C.C., Rybicki B.A., Peterson E.L. Occupational metal exposure and the risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology* 18 (1999a) 303–308.

Gorell J.M., Johnson C.C., Rybicki B.A., Peterson E.L., Kortsha G.X., Brown G.G., Richardson R.J. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 20 (1999b) 239–247.

- Gorell J.M.**, Rybicki B.A., Johnson C.C., Peterson E.L. Smoking and Parkinson's disease: a dose response relationship. *Neurology* 52 (1999c) 115–119.
- Grandinetti A.**, Morens D.M., Reed D., MacEachern D. Prospective study of cigarette smoking and the risk of developing idiopathic of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* 139 (1994) 1129–1138.
- 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.
- Greenmyre J.T.**, MacKenzy G., Peng T., Stephans S.E. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Bioche. Soc. Symp.* 66 (1999) 85–97.
- Halliwell B.**, Gutteridge J. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.* 8 (1985) 22–29.
- Hodgson E.**, Levi P.E. Pesticides: an important but under used model foe the environmental health sciences. *Environ. Health Persp.* 104 (1996) 97–106.
- Hornykiewicz O.**, Kish S.J., Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 45 (1986) 19–34.
- Imai Y.**, Soda M., Takahashi R., Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35661–35664.
- Janson A.M.**, Fuxe K., Goldstein M. Differential effects of acute and chronic nicotine treatment on MTPT (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) induced degeneration of nigostriatal dopamine neurons in the black mouse. *Clin. Investig.* 70 (1992) 232–238.
- Kim R.H.**, Smith P.D., Aleyasin H., Hayley S., Mount M.P., Pownall S., Wakeham, A., You-Ten A.J., Kalia S.K., Horne P., Westaway D., Lozano A.M., Anisman H., Park D.S., Mak, T.W., Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 5215–5220.
- Kopin I.J.**, Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol. Rev.* 37 (1985), 333–364.

- Mandel R.J.**, Bjorklund A., Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J. Neurosci.* 22 (2002) 2780–2791.
- Kruger R.**, Genes in familial parkinsonism and their role in sporadic Parkinson's disease, *J. Neurol.* 251 (2004) 2–6.
- Lai B.C., Marion S.A.**, Teschke K., Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease, *Parkinson's Rel. Dis.* 8 (2002) 297–309.
- Langston J.W.**, Ballard P.A, Tetrud J.W, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meripidine-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.
- Masliah E.**, Rockenstein E., Veinbergs I., Mallory M., Hashimoto, M., Takeda A., Sagara Y., Sisk A., Mucke L., Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implication for neurodegenerative disorders. *Science* 287 (2000) 1265–1269.
- 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.
- Neff N.H.**, Hadjiconstantinou M. Aromatic L-amino acid decarboxylase modulation and Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 106 (1985) 91–97.
- 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.
- Olanow C.W.** Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology* 40 (1990) 32–37.

- Olanow C.W.**, Tatton WG. Etiology and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Annual Rev. Neurosci.* 22 (1999) 123–144.
- Patrick H.U.**, Levy P.M. Parkinson's disease. A clinical study of one hundred and forty-six cases. *Arch. Neurol. Psichiat.* 7 (1922) 711–720.
- Perez F.A.**, Palmiter, R. D., Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 2174.
- Polymeropoulos M.H.**, Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S. Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson, W. G., Lazzarini, A.M., Duvoisin R. C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L., Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 276 (1997) 2045.
- 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.
- Quik M.** Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 27 (2004) 561–568.
- 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.

Rybicki B.A., Johnson C.C., Peterson E.L., Kortsha G.X., Gorrel J.M. A family history of Parkinson's disease and its effects on other Parkinson's disease risk factors. *Neuroepidemiology.* 18 (1999) 270–278.

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.

Sancesario G., Morello M., Reiner A., Giacomini P., Massa R., Schoen S., Bernardi G. Nitroergic neurons make synapses on dual-input dendritic spines of neurons in the cerebral cortex and the striatum of the rat: implication for a post synaptic action of nitric oxide. *Neuroscience* 99 (2000) 627–642.

Sanchez-Ramos J., Overvik E., Ames B.N. A marker of oxyradical-mediated DNA damage (8-hydroxy-2'-Deoxyguanosine) is increased in nigro striatum of Parkinson's disease brain. *Neurodegeneration* 3 (1994) 197–204.

Sasakawa N., Murayama N., Kumakura K., Characterization of exocytotic events from single PC12 cells: Amperometric studies in native PC12h, Daloated PC12h, and bovine adrenal chromaf.n cells, *Cell. Mol. Neurobiol.* 25 (2005) 777–787.

Selley M.L. (E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Free Rad. Biol. Med.* 25 (1998) 169–74.

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-morpholinosydnonimine (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.

Schubert D., La Corbiere M., Klier F.G., Steinbach J.H. The modulation of neurotransmitter synthesis by steroid hormones and insulin. *Brain Res.* 190 (1980) 67–79.

Schubert D., Klier F.G. Storage and release of acetylcholine by a clonal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74 (1977) 5184–5188.

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.

Semchuk K.K., Love E.J., Lee R.G. Parkinson's disease: A test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology.* 46 (1993) 1173–80.

Shimura H., Hattori N., Kubo S., Mizuno Y., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Iwai K., Chiba T., Tanaka K., Suzuki T., Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25 (2000) 302–305.

Singleton A. B., Farrer M., Jhonson, J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson, M., Maraganore D., Adler C., Cookson M.R., Muentner M., Baptista M., Miller D., Blancato J., Hardy J., Gwinn-Hardy K., Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science.* 302 (2003) 841.

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.

Stefanis L., Larsen K.E., Rideout H.J., Sulzer D., Greene L.A., Expression of A53T mutant but not wild-type a-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J. Neurosci.* 21 (2001) 9549–9560.

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.

Thiruchelvam M., Brockel B., Richfield E., Baggs R., Cory-Slechta D. Potentiated and preferential effect of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine system: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res.* 873 (2000) 225–234.

Tischler A.S., Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 971 (2002) 366–370.

Tischler A.S., Perlman R.L., Morse G.M., Sheard B.E. Glucocorticoids increase catecholamine synthesis and storage in PC12 pheochromocytoma cell cultures. *J. Neurochem.* 40 (1983) 364–370.

Travis E.R., Wightman R.M., Spatio-temporal resolution of exocytosis from individual cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27 (1998) 77–103.

Uversky V.N., Li J., Bower K., Fink A.L. Synergistic effects of pesticides and metals on the fibrillation of α -synuclein: implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 23 (2002) 527–536.

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.

Van der Putten H., Wiederhold K.H., Probst A., Barbieri S., Mistl C., Danner S., Kauffmann S., Hofele K., Spooren W. P., Ruegg M. A., Lin S., Caroni P., Sommer B., Tolnay M., and Bilbe, G., Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein *J. Neurosci.* 20 (2000) 6021–6029.

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.

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.

Zarranz J.J., Alegre J., Gomez-Esteban J. C., Lezcano E., Ros E., Ampuero I., Vidal L., Hoenicka J., Rodriguez O., Atares B., Llorens V., Gomez Tortosa E., del Ser, T., Munoz D.G., de Yebenes J. G. The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55 (2004) 164–173.

Zecca L., Tampellini D., Gatti A., Crippa R., Eisner M., Sulzer D., Ito S., Fardello R., Gallorini M. The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals. *J. Neural Transm.* 109 (2000) 663–672.