



Università degli studi di Sassari

Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche

Direttore della scuola: Prof. Andrea Piana

INDIRIZZO IN NEUROSCIENZE

Responsabile di indirizzo: Prof.ssa Maria Speranza Desole- Dott.ssa Rossana Migheli

XXVII CICLO

***Sviluppo di un nuovo sistema per la
discriminazione tra il consumo di ossigeno e la
variazione del flusso ematico regionale
cerebrale***

Direttore:

Prof. Andrea Piana

Tutor:

Dott.ssa Gaia Rocchitta

Tesi di dottorato del Dott.

Manuel Zinellu

Co-Tutor:

Prof. Ing. Nicolae Vaszilcsin

Nature has protected the brain, not only against gravitational and traumatic stresses, but also against the prying eyes and hands of scientists.

Seymour S. Kety, 1979



Durante i tre anni del mio dottorato ho frequentato il laboratorio del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Sassari e per un periodo di otto mesi il laboratorio del dipartimento di chimica applicata e ingegneria dei composti inorganici e dell'ambiente, presso l'Università Politecnica di Timisoara.

Sommario

1 INTRODUZIONE.....	1
1.1 Ossigeno dipendenza delle forme di vita aerobiche	1
1.2 Distribuzione di ossigeno ai distretti cellulari.....	3
1.3 Ruolo dei mitocondri.....	7
1.4 Aspetti fisiologici delle specie radicaliche	7
1.5 Ruolo degli antiossidanti endogeni ed esogeni	8
1.6 H ₂ come antiossidante esogeno	10
1.7 Stress ossidativo e neurodegenerazione.....	11
1.8 Neurotossine e ROS	12
1.9 MPTP e degenerazione dopaminergica nigrostriatale	12
1.10 Esperimenti su colture cellulari	14
1.11 Flusso ematico cerebrale.....	15
1.12 Tecniche di monitoraggio del flusso ematico cerebrale.....	17
1.13 Cinetica di diffusione dei gas applicata alla misurazione dei flussi ematici	20
1.14 Tecnica della clearance di idrogeno	22
2. SCOPO DELLA RICERCA	25
3 MATERIALI E METODI.....	26
3.1 Reagenti e soluzioni	26
3.2 Costruzione dell'elettrolizzatore.....	26
3.3 Tecniche voltammetriche	29
3.4 Cella elettrochimica	32
3.5 Nanostrutturazione dei micro sensori	32
3.6 Costruzione e calibrazione del sensore per l'ossigeno	35
3.7 Costruzione del sensore per l'idrogeno	37
3.8 Cenni di chimica dell' elettrodeposizione e parametri utilizzati.....	39

3.9 Calibrazione del sensore per l'idrogeno.....	41
3.10 Microdialisi in vitro.....	42
3.11 Procedure microdialitiche	44
3.12 Coltura cellulare.....	44
3.13 Vitalità delle PC12 prima e dopo gli esperimenti.....	45
3.14 Analisi statistica	45
3.15 Schema dispositivo.....	46
4 RISULTATI E DISCUSSIONE	49
4.1 Microsensore per l'O ₂	49
4.2 Sensibilità del microsensore per l'O ₂	50
4.3 Microsensore per l'H ₂ : platinizzazione del microsensore al carbonio	52
4.4 Sensibilità del microsensore per l'idrogeno	53
4.5 Stabilità nel tempo del micro sensore per l'idrogeno.....	54
4.6 Potenziali interferenze sul sensore per l'idrogeno	55
4.7 Effetto dell'elettrolisi sulla vitalità cellulare	58
4.8 Impiantabilità del microsensore per l'idrogeno	59
4.9 Esperimenti di clearance: gas forniti da bombole e prodotti per elettrolisi	59
4.10 Test sulle cellule.....	62
4.11 Le cellule fissate con etanolo non consumano O ₂	64
4.12 Effetto delle PC12 sulla clearance di idrogeno e ossigeno	66
4.13 Effetto dell'MPP ⁺ sulle cellule PC12	67
4.14 Elettroattività dell' MPP ⁺	68
4.15 Consumo di O ₂ nelle cellule trattate con MPP ⁺	70
4.16 Effetto delle PC12, dell'MPP ⁺ e delle cellule fissate sulle correnti dei sensori...71	
4.17 Clearance dell'H ₂ a seguito del trattamento delle PC12 con MPP ⁺	73
4.18 Clearance dell'O ₂ a seguito del trattamento delle PC12 con MPP ⁺	74

4.19 Saggi di vitalità	75
5 CONCLUSIONI	77
6 RIASSUNTO	81
7 BIBLIOGRAFIA	83

1 INTRODUZIONE

L'O₂ molecolare è un elemento fondamentale per la sopravvivenza delle forme di vita aerobiche. Sebbene l'O₂ abbia un ruolo centrale nella formazione dell'energia sottoforma di ATP, il suo trasporto, l'ossigenazione delle cellule e i sistemi di rilevamento dell'ossigeno sono aspetti critici per lo svolgimento di una corretta fosforilazione ossidativa a livello mitocondriale. Oltre che nella produzione di ATP, l'ossigeno molecolare può anche essere trasformato in specie altamente reattive (ROS) che giocano un ruolo utile nelle normali funzioni fisiologiche; tuttavia, queste possono risultare dannose per l'organismo in quanto possono compromettere l'equilibrio fisiologico tra il sistema antiossidante endogeno e gli agenti proossidanti. I livelli dell'ossigenazione cellulare e tissutale sono strettamente controllati dal consumo e dal trasporto dell'ossigeno cellulare, mantenendo lo stato normale della fosforilazione ossidativa. In seguito al cambiamento degli stati ossigenativi tissutali e cellulari (ad esempio nel caso di ipossia e iperossia), l'ossigeno molecolare si allontana e viene trasformato in ROS che sono dannosi per l'omeostasi fisiologica. Questo fenomeno si riscontra spesso in una pletera di condizioni fisiopatologiche e malattie. Un'ampia comprensione del comportamento dell'ossigeno molecolare in termini di trasporto, sensori, fosforilazione ossidativa e produzione fisiologica e fisiopatologica di ROS a diversi livelli di ossigenazione offrirebbe un miglioramento delle strategie terapeutiche di gravi disturbi e malattie ossigeno correlate.

1.1 Ossigeno dipendenza delle forme di vita aerobiche

L'Ossigeno costituisce quasi il 21% dell'atmosfera terrestre e pur essendo indispensabile per la vita aerobica, può rappresentare anche un grave pericolo (Freeman BA. 2000; Lane N. 2002).

Le forme dannose dell'ossigeno comprendono i radicali liberi, le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'ossigeno singoletto.

Negli organismi viventi l'energia viene ottenuta mediante il processamento di diversi substrati nella respirazione anaerobica o aerobica. La prima via non prevede l'utilizzo di ossigeno, e non costituisce un sistema efficiente di produzione di energia sotto forma di adenosina-5'-trifosfato (ATP). Al contrario, negli organismi aerobi, la respirazione cellulare prevede l'ossidazione catalizzata da enzimi dei substrati combustibili (primariamente ossigeno) per generare l'energia necessaria ai processi biologici. La respirazione aerobica ha inizio nel citoplasma con la glicolisi e prosegue nei mitocondri con il ciclo di *Krebs*, la fosforilazione ossidativa e la catena di trasporto degli elettroni (fig.1).

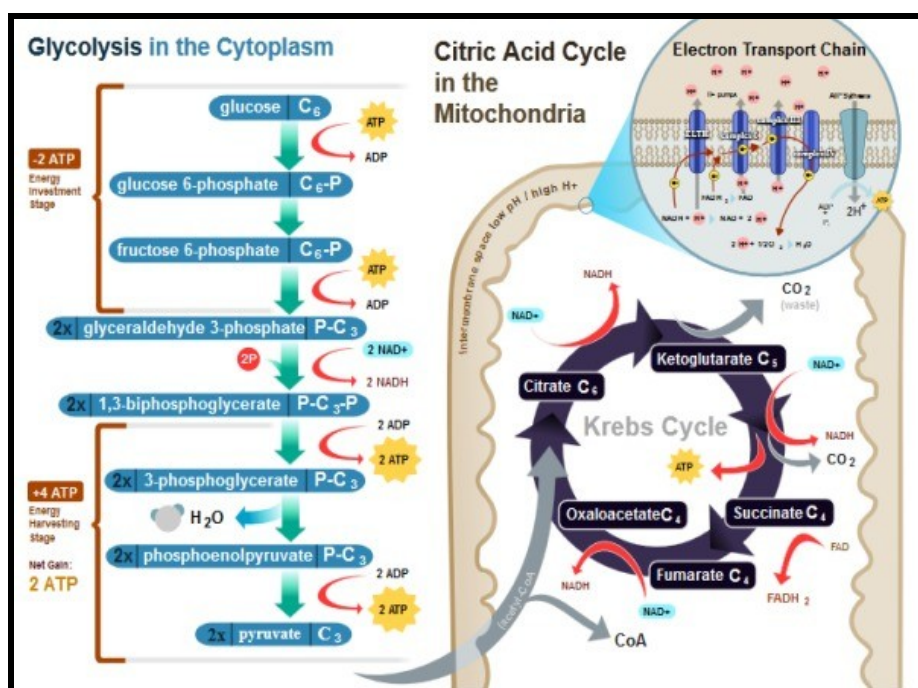


Fig.1 Schema delle reazioni della respirazione cellulare.

Nell'ultima tappa della respirazione, l'ossigeno si riduce di 4 elettroni generando acqua e ATP. Il processo aerobico forma 28 molecole di ATP contro le sole 2 prodotte dalla respirazione anaerobica. Tale evidenza sottolinea l'importanza dell'ossigeno nell'ottimizzare l'utilizzo dei substrati energetici (es. Glucosio).

1.2 Distribuzione di ossigeno ai distretti cellulari

Negli organismi complessi, la distribuzione di ossigeno ai distretti cellulari è sotto il controllo del sistema nervoso. Specifici neurosensori regolano la respirazione monitorando i livelli ematici di O₂, CO₂ e pH.

L'ossigeno viene trasportato dai polmoni ai tessuti periferici soprattutto legato alle molecole di emoglobina dalla quale si libera per gradiente di concentrazione. Le cellule impegnate nella respirazione, determinano un gradiente di concentrazione di ossigeno tra differenti interfacce: spazio extracellulare/membrana plasmatica, membrana plasmatica/citoplasma e citoplasma/mitocondri. Il mitocondrio, consumando ossigeno, lo richiama continuamente al suo interno con un controllo metabolicamente guidato.

La reazione netta della respirazione cellulare è:



Da tale reazione si deduce che se la respirazione cellulare riduce la sua velocità oppure si ferma, viene meno il gradiente di ossigeno e il suo utilizzo da parte delle cellule (Stryer, L 1995). Analogo problema sorge se viene meno l'apporto di ossigeno mediante il sangue: in questi casi si parla di ischemia che causa la deficienza o la totale mancanza di ossigeno nei tessuti provocando ipossia o anossia.

In quest'ultimo caso, pur essendo presenti i gradienti di pressione parziale di ossigeno (pO₂) nei vari distretti, la respirazione si arresta per il mancato apporto di ossigeno tramite il flusso ematico.

L'ingresso di ossigeno e la formazione dei gradienti intracellulari sono regolati dalla composizione lipidica delle membrane, infatti, un contenuto eccessivo di colesterolo riduce la permeabilità dell'ossigeno nei globuli rossi (Buchwald et al , 2000).

La gran parte dell'ossigeno che entra in una cellula viene impiegato nella fosforilazione ossidativa mitocondriale per la formazione di ATP.

Una quota di ossigeno è substrato di diverse ossidazioni catalizzate da ossigenasi non mitocondriali nelle quali il ferro interviene nell'attivazione

dell'ossigeno e nel suo metabolismo in base alla disponibilità cellulare e alla sua valenza (Groves JT., 2003). Tuttavia è noto che un ambiente cellulare ricco di metalli come ferro e rame, comporta l'ossidazione non enzimatica di importanti biomolecole come catecolamine, lipidi, proteine e DNA mediante reazioni di *Fenton*.

Tali reazioni contribuiscono anche al consumo non respiratorio e non mitocondriale di ossigeno.

Le reazioni ossidative catalizzate dalle mono e di-ossigenasi e in generale le ossidazioni non mitocondriali, nelle quali l'ossigeno molecolare è coinvolto, sono fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi cellulare fisiologica

Le variazioni di ossigeno nell'organismo vengono continuamente monitorate a vari livelli per mantenere una corretta omeostasi. Il rilevamento di uno stato di ipossia da luogo ad un incremento della ventilazione polmonare mediante l'aumento della frequenza respiratoria.

A livello sistemico la carenza di ossigeno viene rilevata mediante l'attivazione di specifici sensori. A livello carotideo, a seguito di ipossia, si induce la depolarizzazione di specifici recettori con attivazione di eventi a cascata (Prabhakar NR., 2000).

Altri meccanismi di rilevamento dell'ossigeno si trovano a livello locale (cellule e tessuti) e numerosi studi propongono diversi responsabili dell'omeostasi dell'ossigeno. Alcuni di questi sono: i canali del calcio e del potassio, l'ossido nitrico, l'anidride carbonica, il monossido di carbonio e l'ATP rilasciato dai nervi (Lahiri S. et al., 2006; Hoshi T et al., 2004). Tutti gli studi confermano il coinvolgimento delle specie reattive all'ossigeno (ROS) nel rilevamento dei livelli di ossigeno ma non si conosce ancora oggi l'esatto ruolo di ciascuno di essi. Esistono anche i recettori per l'iperossia e il p38MAPK è la molecola regolatoria che attiva la produzione dei ROS a partire da ossigeno molecolare (Sen CK. et al., 2006). Gli organi dei mammiferi svolgono le loro funzioni a livelli di pO_2 che variano tra 90 e < 3 torr in stati di normossia (Roy S. et al., 2003).

E' stato dimostrato (Niteen et., al 2008) che il metabolismo si adatta ad un difetto di pO_2 mediante un meccanismo di iperossia acquisita volto al rimodellamento cellulare e alla protezione/limitazione del danno (precondizionamento ischemico).

Il corretto funzionamento dei sistemi di rilevamento di ossigeno risulta di fondamentale importanza, infatti, problemi a questo livello sono associati a numerose patologie come cancro, ipertensione, apnea notturna, infarto, ictus e la sindrome della morte improvvisa del lattante (Sieck GC., 2004). I processi fisiologici degli organismi aerobici vengono alterati da una concentrazione di ossigeno che diverge dall'intervallo di cosiddetta normossia, ovvero dal livello di pO_2 richiesto dall'organismo affinché avvengano i normali processi fisiologici. L'ipossia è una deficienza di ossigeno conseguente alla differenza tra l'apporto e il consumo di O_2 da parte dell'organismo che conduce al danno cellulare. Questa condizione può estendersi ai tessuti provocando infarto, ictus e anossia. Al contrario, livelli di O_2 superiori alla norma (iperossia) danneggiano i tessuti polmonari e il SNC e, in caso di iperossia prolungata, portano alla morte dovuta al danno ossidativo.

L'ipossia e l'iperossia sono accomunate dalla produzione di ROS nelle cellule. Non esistono livelli assoluti di pO_2 che indichino l'inizio di ipossia o iperossia in quanto ogni organo e tessuto varia il fabbisogno di ossigeno a seconda della propria attività.

Durante la reazione di riduzione dell'ossigeno ad acqua vengono generati fisiologicamente anche intermedi reattivi, specie radicaliche e non radicaliche. Tra le specie radicaliche dell'ossigeno (atomi o molecole aventi un elettrone spaiato) rientrano il radicale ossidrilico ($OH\cdot$), l'anione superossido (O_2^-), il radicale perossido ($RO_2\cdot$) ed il radicale idroperossido (HO_2). Esistono anche specie reattive all'azoto (RNS) come il perossinitrito ($OONO\cdot$) e l'ossido nitrico (NO). Tra i ROS non radicalici rientrano l'acqua ossigenata (H_2O_2), l'ossigeno singoletto ($O_2\cdot$), l'ozono (O_3) e l'acido ipocloroso (HClO).

Le specie reattive dell'ossigeno sono generate continuamente all'interno degli organismi aerobici, come prodotto collaterale del metabolismo energetico durante la fosforilazione ossidativa. Fattori esogeni come il fumo, l'inquinamento atmosferico, l'esposizione ai raggi ultravioletti, l'irradiazione, l'esercizio fisico intenso e lo stress psicologico contribuiscono alla generazione di ROS (Liu et al., 1996, Agarwal, 2005 Harma et al., 2006 , Tanriverdi et al., 2006 e Grassi et al., 2010). Quando i ROS vengono prodotti eccessivamente o la capacità antiossidante endogena è diminuita, l'ossidazione indiscriminata causa effetti nocivi, con conseguente instaurarsi di uno "stress ossidativo". Lo stress ossidativo acuto deriva da differenti condizioni: infiammazione, ischemia/riperfusion, infarto cardiaco o cerebrale, trapianto di organi e cessazione di sanguinamento operatorio (Ferrari et al, 1991 Vaziri e Rodriguez-Iturbe, 2006 e Reuter et al. , 2010). Diversi studi hanno dimostrato una correlazione tra stress cronico ossidativo e una vasta gamma di patologie, comprese malattie maligne, diabete mellito, aterosclerosi e processi infiammatori cronici così come molte malattie neurodegenerative e il processo di invecchiamento (Andersen, 2004 Bagul e Banerjee 2013 , El Assar et al., 2013 e Kim e Byzova, 2014). In condizioni normali, la produzione dei ROS è anche promossa da un intenso esercizio fisico che conduce ad un affaticamento muscolare (Westerblad & Allen, 2011). Inoltre, i ROS derivano da reazioni catalizzate da enzimi come le ossidasi e da altri meccanismi, come il metabolismo di droghe e l'auto ossidazione di catecolammine.

L'ossigeno trasformato in anione superossido, viene convertito dall'enzima superossido dismutasi in perossido d'idrogeno(H_2O_2), quest'ultimo, a sua volta, viene trasformato in acqua dall'enzima catalasi. Tuttavia, in presenza di cationi di rame, ferro e cobalto viene catalizzata la trasformazione dell'acqua ossigenata in ione e in radicale ossidrilico tramite reazione di *Fenton* (Shigeo Ohta, 2014).

1.3 Ruolo dei mitocondri

La centrale energetica delle cellule eucariotiche, risiede nei mitocondri, che sono delle strutture specializzate nella conservazione dell'energia sottoforma di ATP. Questi organuli riducono l'ossigeno ad acqua in diverse tappe nelle quali vengono prodotte anche specie radicaliche.

Condizioni patologiche aumentano la produzione di tali sostanze estremamente reattive e la loro diffusione al di fuori della catena respiratoria mitocondriale. Viene innescato, così, un circolo vizioso in quanto lo stress ossidativo, mediante reazioni a catena, contribuisce allo sviluppo di patologie le quali alimentano la formazione di ROS.

Nei mitocondri, sempre per riduzione incompleta dell'ossigeno, vengono prodotti anche radicali all'azoto (NOS). L'ossigeno è inoltre coinvolto nei meccanismi di regolazione di sopravvivenza e di morte cellulare.

Per mantenere inalterato l'equilibrio redox della cellula è di fondamentale importanza l'integrità dell'enzima SOD (superossido dismutasi) mitocondriale, infatti, quest'ultimo garantisce l'omeostasi e determina la sopravvivenza o la morte apoptotica della cellula (Buettner GR. et al., 2006).

Data l'implicazione dei ROS in numerose patologie, viene considerata con particolare attenzione la possibilità di controllare l'azione dei radicali (prodotti nei mitocondri) con l'ausilio degli antiossidanti.

1.4 Aspetti fisiologici delle specie radicaliche

Molteplici studi hanno ampiamente dimostrato che i ROS, oltre alla loro azione dannosa, svolgono anche importanti compiti di difesa nei confronti di processi fisiologici cellulari e sistemici (Baas AS. et al., 1995; Moldovan L. et al., 2004) quali l'apoptosi, l'invecchiamento, la trasduzione dei segnali e agiscono come mediatori intracellulari.

Le specie reattive dell'azoto (RNS) causano danni ossidativi quando interagiscono con il perossido (ROS) per formare perossinitrito. Di notevole importanza è, in questo caso, il contributo positivo che il nitrossido (NO) porta

al regolare funzionamento dell'organismo, tanto da giustificare la produzione endogena da parte dell'enzima NOs sintetasi. L'ossido nitrico (radicale stabile) è coinvolto per esempio nella regolazione delle funzioni cardiovascolari, agendo sulla muscolatura liscia per indurre vasodilatazione. La nitroaspirina è un farmaco (appartenente alla classe delle COX-inibitori a rilascio di monossido di azoto) importante che combina l'azione inibitrice sulle cicloossigenasi al rilascio del monossido d'azoto (Carini et al., 2004). NO è inoltre responsabile, insieme allo stimolo mentale, della risposta erettile, nonché dell'azione farmacologica dei farmaci attivi su tale disturbo.

1.5 Ruolo degli antiossidanti endogeni ed esogeni

Gli antiossidanti endogeni ed esogeni, attraverso diversi meccanismi, proteggono le cellule dai danni causati dai ROS e mantengono l'equilibrio omeostatico *redox* dell'intero organismo.

Esistono antiossidanti endogeni, sintetizzati dal metabolismo cellulare e antiossidanti esogeni che vengono integrati con la dieta. Gli antiossidanti si distinguono, inoltre, in enzimatici e non enzimatici.

La superossido dismutasi (SOD), la tiredoxina, la catalasi, la glutatione perossidasi e la reduttasi fanno parte degli antiossidanti enzimatici (Blokhina O. et al., 2003). Quelli non enzimatici comprendono i tioli come il glutatione (GSH), le vitamine A, B6, B1, C ed E; i β -carotenoidi, il selenio e l'acido folico (Mandelker L., 2004). Le vitamine e i polifenoli, fanno parte degli antiossidanti esogeni, in quanto l'uomo non possiede il corredo enzimatico adatto alla biosintesi di tali molecole.

Per esplicitare al meglio la loro azione protettiva, i diversi tipi di antiossidanti devono svolgere la loro funzione sinergicamente ed è stato dimostrato che i vari sistemi di protezione vengono attivati proprio dalle molecole pro ossidanti (Winyard PG. et al., 2005).

Un bilancio corretto tra agenti ossidanti e sistema antiossidante, consente la protezione delle cellule dall'invecchiamento, prevenendo malattie

cardiovascolari e tumori, in quanto lo stress ossidativo si è rivelato essere un importante fattore scatenante (fig.2).

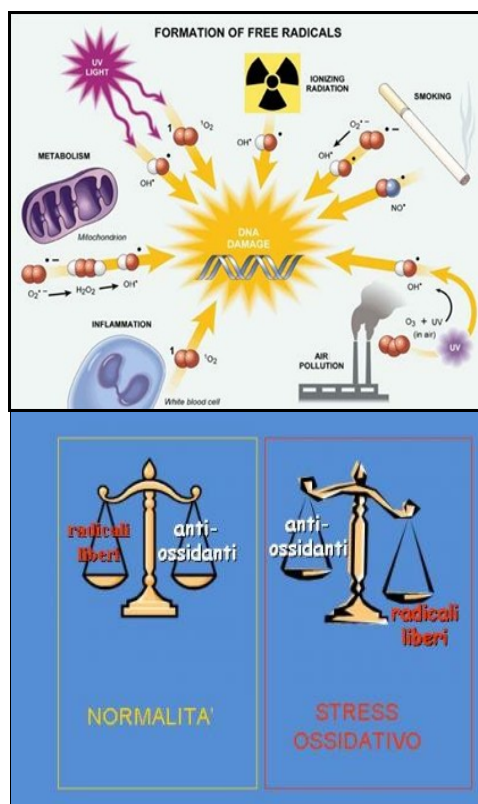


Fig.2 fattori di rischio per la formazione dei ROS

Il meccanismo che regola l'attività antiossidante dell'organismo, attualmente è ampiamente studiato, con lo scopo di individuare molecole che possiedano proprietà antiossidante da utilizzare come farmaci per prevenire o curare diverse condizioni patologiche.

È importante considerare che il comportamento di un antiossidante è condizionato dall'ambiente circostante, infatti, esso può agire sia da antiossidante che da pro-ossidante generando ROS e inducendo a sua volta uno stress ossidativo. Tale fenomeno si manifesta, per esempio, in un ambiente ricco di metalli e ossigeno, limitando fortemente l'impiego dell'antiossidante per esempio sottoforma di integratore alimentare (Steinhubl, S.R. 2008, Bjelakovic et al., 2007).

1.6 H₂ come antiossidante esogeno

Considerata l'importanza delle specie ad attività ossidante nel mantenimento dell'omeostasi *redox*, possiamo definire antiossidante ideale quella molecola capace di ridurre lo stress ossidativo in eccesso, senza eliminare le altre specie che fungono da segnali cellulari.

La maggior parte dei comuni antiossidanti, invece, tendono a ridurre indiscriminatamente le specie reattive, come l'anione superossido ed H₂O₂ che sono definiti molecole segnale.

La specie radicalica più dannosa è il radicale idrossile OH[•]. Esso sembrerebbe essere il *targhet* più indicato per combattere gli effetti dello stress ossidativo.

A tal proposito, alla luce dei recenti studi, sembrerebbe che il candidato ideale a svolgere la funzione di antiossidante sia una molecola da tempo conosciuta e ritenuta inerte, al punto da essere impiegata come tracciante per il monitoraggio del flusso ematico locale: l'idrogeno molecolare (H₂). Questo gas, di piccole dimensioni, ampiamente diffusibile in tutti i tessuti e sicuro dal punto di vista tossicologico, (Abraini et al., 1994; Lillo et al., 1997; Fontanari et al., 2000; Lillo & Parker, 2000) è attualmente oggetto di studio in virtù della sua capacità di donare elettroni a molecole ossidanti (comportandosi da agente riducente) risultando una molecola dalle proprietà antiossidanti (Ohsawa et al., 2007).

Un gran numero di studi hanno esplorato gli effetti terapeutici e preventivi dell'H₂ in particolare i suoi effetti biologici contro lo stress ossidativo in quasi tutti gli organi (Ohta, 2011, 2012). Inoltre, è stato dimostrato che l'H₂ svolge diverse funzioni come: attività anti-infiammatoria e anti-apoptotica, effetti anti-allergici e stimola il metabolismo energetico nella maggior parte dei tessuti dei modelli animali. Fino al 2013, sono stati pubblicati un numero di lavori sempre crescente (oltre 300) riguardanti i suoi effetti benefici di tipo biologico e medico.

Il motivo della straordinaria capacità ed efficacia antiossidante dell'idrogeno risiede nella relativamente bassa capacità riducente del gas. Questa proprietà

gli consente di reagire con le specie ossidanti più reattive come il radicale ossidrilico e il perossinitrito, lasciando inalterate le specie meno ossidanti come il perossido di idrogeno e l'anione superossido (Ohta 2014).

1.7 Stress ossidativo e neurodegenerazione

Un gran numero di patologie, correlate alla carenza o all'eccesso di O₂, possiedono come fattore comune la produzione di ROS e lo stress ossidativo associato. Nel caso in cui l'organismo non riesca a ripristinare l'equilibrio *redox*, prevale l'azione dannosa dei radicali che conduce a sofferenza cellulare e dunque a differenti patologie. Fra tutti gli organi, il cervello è il più suscettibile a insulti di questa natura poichè essendo notevolmente ossigenato ha più probabilità di produrre ROS.

Lo stress ossidativo contribuisce in buona misura alle condizioni patologiche di alcune tra le più importanti malattie neurodegenerative come la Sclerosi Laterale Amiotrofica (ASL), il morbo di Parkinson e l' Alzheimer (Abou-Sleiman PM. et al., 2006; Simonian NA. et al., 1996). L'ossigeno è inoltre responsabile di disturbi vascolari come aterosclerosi, ischemia, infarti e ictus.

Durante un'ischemia, i tessuti privati di ossigeno e nutrienti, innescano la produzione di ROS che causano danno alle strutture cellulari, il disaccoppiamento del trasporto elettronico mitocondriale, l'interruzione della fosforilazione ossidativa ed infine la morte cellulare. Le specie reattive all'ossigeno e lo stress ossidativo, giocano un ruolo importante anche nello sviluppo di tumori e cancro, in quanto intercorrono strette relazioni tra i danni alle proteine, ai lipidi e al DNA causati dai radicali e il cancro (Storz P., 2005). L'Ossigeno, nello stato di ipossia, è coinvolto (sempre in relazione allo stress ossidativo) anche in diverse patologie polmonari, compresa l'asma, dove risulta molto importante il sistema di difesa antiossidante della glutatione perossidasi. Questo enzima è capace di proteggere i tessuti da un danno ossidativo.

La letteratura riporta, inoltre, un coinvolgimento dell'ossigeno nella regolazione delle fasi del sonno. Più precisamente, tra la fase *non REM* e quella *REM* vi è un incremento del flusso ematico cerebrale e dell'apporto glicemico al cervello a

dispetto di una diminuzione dell'apporto di O₂ (Lenzi P. et al., 2000). Infatti, la fase *REM* è caratterizzata da un metabolismo glicolitico sostanzialmente anaerobico e la differenza di apporto di O₂ regola la durata delle fasi *REM* e *non REM*. Condizioni di ipossia diminuiscono la durata della fase *REM*, viceversa, condizioni di iperossia contribuiscono ad aumentarla.

1.8 Neurotossine e ROS

Un contributo importante alla produzione di ROS, deriva dalla qualità dell'aria nell'ambiente circostante.

Gli inquinanti ambientali solidi, liquidi e gassosi come: virus, batteri e tossine, scarti industriali e biologici, metalli pesanti, gas di scarico, e ozono, una volta introdotti nel nostro organismo, si combinano con l'ossigeno per formare i ROS. L'erbicida d'uso più comune, il *Paracquat*, possiede una spiccata tossicità negli animali e nell'uomo manifestata mediante il suo meccanismo d'azione che prevede la formazione dell'anione superossido (Han JF. et al., 2006). Il *Paracquat* si è dimostrato un importante fattore di rischio nell'insorgenza del Parkinson, danneggiando le cellule dopaminergiche dell'area nigro-striatale del cervello (Thiruchelvam M. et al., 2000; Izumi Y. et al., 2014).

Tra i pesticidi, il Rotenone, è responsabile dell'inibizione del complesso I (della catena di trasporto elettronico) mitocondriale, e utilizzato in animali da esperimento causa una lesione nigro striatale paragonabile a quella che si riscontra nel morbo di Parkinson (Testa CM. et al., 2005).

1.9 MPTP e degenerazione dopaminergica nigrostriatale

La neurotossina, la *1-metil4-fenil1,2,3,6-tetraidro-piridina* (MPTP), prodotto di scarto di sintesi della cosiddetta "*eroina sintetica*", è responsabile di un importante danno neurobiologico a carico delle cellule dopaminergiche del SNC.

L'MPTP è un modello ampiamente utilizzato per lo studio delle alterazioni biochimiche indotte dal Parkinson grazie alla sua capacità di indurre gran parte delle lesioni cellulari, specie quelle a carico della *substanza nigra pars*

compacta e i relativi sintomi caratteristici della malattia neurodegenerativa (George C. et al., 1986). L'MPTP, sufficientemente lipofilo da penetrare la barriera ematoencefalica, viene trasformato dagli enzimi gliali monoamminoossidasi di tipo B (MAOB) a MPDP, il quale si ossida, probabilmente spontaneamente, nella molecola attiva 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), (Desole M.S. et al., 1997). L'azione tossica, espletata dal metabolita MPP⁺, è preceduta dal suo ingresso nella cellula dopaminergica per mezzo del trasportatore per la dopamina DAT come conseguenza della sua affinità. Una volta all'interno del neurone dopaminergico, l'MPP⁺ svolge la sua azione sul mitocondrio sia nella fase di trasferimento degli elettroni per mezzo del citocromo Q, (complesso I) ma anche agendo (sempre attraverso l'interruzione della catena respiratoria) sugli altri complessi enzimatici mitocondriali.

Le conseguenze causate dal danno da parte dell'MPP⁺ comprendono il blocco dell'afflusso degli elettroni, l'abbattimento della produzione di ATP e l'aumento della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) soprattutto dell'anione superossido O₂⁻. Queste importanti alterazioni fisiologiche compromettono le funzioni vitali del neurone che vengono aggravate da un sinergico aumento dello stress ossidativo portando alla morte cellulare (Przedborski S. et al., 2000, Arif I.A. and Khan H.A. 2011). L'ingresso dell'MPP⁺ nel citoplasma neuronale, interferisce con i sistemi di immagazzinamento vescicolare della dopamina, la quale viene rilasciata pericolosamente con conseguente formazione di metaboliti tossici altamente reattivi che contribuiscono al malfunzionamento dei mitocondri, allo stress ossidativo e all'ulteriore morte cellulare (Hastings T.G. 2009). Esperimenti *in vivo* mettono in evidenza che le cellule dopaminergiche dell'area extrapiramidale subiscono danni ossidativi irreversibili con la conseguente perdita funzionale della trasmissione dopaminergica (fig.3).

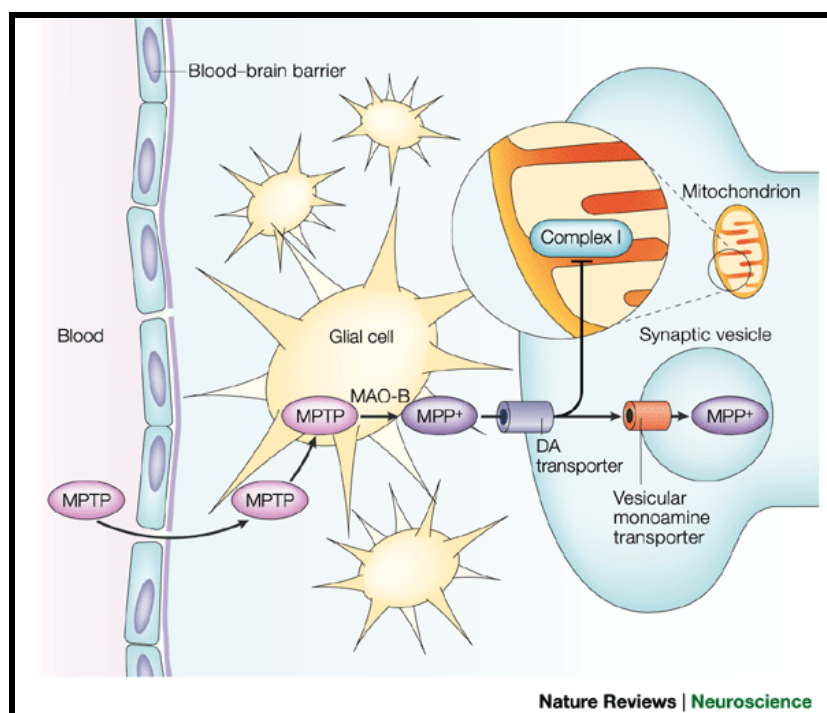


Fig. 3 meccanismo d'azione dell'MPTP (Nature Reviews Neuroscience ISSN: 1471-003X EISSN: 1471-0048).

1.10 Esperimenti su colture cellulari

Oltre che nei modelli in vivo, l'MPTP è utilizzato come tossina negli esperimenti in vitro. Le PC12 sono state utilizzate per ottenere numerose informazioni riguardo le patologie del cervello, compresi studi sull'ipossia delle cellule neuronali che studi relativi alla malattia di Parkinson (Westerink 2008).

La linea cellulare PC12 deriva da un feocromocitoma ed è stata originariamente isolata dalla midollare del surrene di ratto nel 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 and Rein, 1977).

Questa linea cellulare viene spesso usata come un modello in vitro per lo studio della 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). 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.

1.11 Flusso ematico cerebrale

Il cervello riceve circa il 15% della gittata cardiaca con un flusso ematico cerebrale (FEC) pari a 50 ml/min per 100 g di tessuto. La distribuzione del flusso ematico non è uniforme, infatti, la sostanza grigia riceve circa 80 ml/100 mg/min, mentre, la sostanza bianca 20 ml/100 mg/min (Folino A.F. 2007). Il FEC dipende sia dalla pressione di perfusione centrale (PPC) che dalla resistenza vascolare cerebrale (RVC). La forza che spinge il sangue al cervello (espressa dal PPC) deriva dalla differenza tra la pressione del sangue arterioso dei grossi vasi (che portano il sangue al cervello) e la pressione venosa che drena il sangue dal circolo cerebrale.

La resistenza vascolare, a livello della circolazione cerebrale, è influenzata dal diametro arteriolare. Altri fattori reologici, quali la lunghezza dei vasi e la viscosità ematica, diventano rilevanti solo in condizioni patologiche. In condizioni fisiologiche, la pressione di perfusione è costante, perciò, il flusso ematico cerebrale dipende principalmente dalla resistenza vascolare. A riposo, il calibro arteriolare medio viene modulato anche da fattori umorali quali la concentrazione di H^+ e K^+ (che favoriscono la vasodilatazione arteriolare), Ca^{++} (che promuove la vasocostrizione) O_2 e CO_2 . Quest'ultimo è il più potente

agente vasodilatatore, infatti, è sufficiente un incremento della sua pressione parziale di 1 mmHg per aumentare del 2% il flusso ematico cerebrale. L'effetto dell'ossigeno sulla circolazione cerebrale è minimo e diversi studi indicano che un ruolo significativo è rivestito da altri fattori umorali. Questi fattori, quali l'angiotensina, la vasopressina e fattori endotelio-dipendenti sono capaci di modulare l'attività contrattile dei vasi cerebrali (Faraci F.M. et al., 1998).

Il flusso ematico cerebrale è sottoposto ad autoregolazione, vale a dire costantemente regolato e mantenuto entro limiti definiti. Più precisamente, quando la perfusione si riduce, automaticamente si verifica vasodilatazione cerebrale e viceversa. Questo meccanismo è efficiente entro valori di PPC compresi tra 60 e 150 mmHg. Oltre questo *range* di valori il FEC dipende direttamente dalla pressione sistemica (Strandgaard S. et al., 1984; Paulson O.B. et al., 1990).

Un altro importante fattore di controllo del FEC è rappresentato dal metabolismo neuronale. Il fabbisogno energetico del tessuto nervoso è fornito principalmente dall'ossidazione del glucosio. Le riserve tissutali di glucosio sono sufficienti solo per 2-3 minuti e non vi è alcuna riserva di ossigeno, quindi la vitalità cerebrale dipende da un apporto ematico continuo. Questo, spiega perché nonostante il cervello rappresenti solo il 2% del peso corporeo, esso riceva oltre il 15% della gittata cardiaca e consumi il 20% di O₂ e glucosio. Il parenchima cerebrale dipende, quindi, quasi esclusivamente dal catabolismo del glucosio e dalle riserve energetiche cerebrali (glicogeno e molecole ad alto contenuto energetico quali ATP o creatinfosfato). Anche una breve interruzione del flusso è sufficiente a determinare un esaurimento delle riserve energetiche. Il flusso cerebrale medio (50-55 ml per 100 mg/min) varia in relazione al livello di attività del tessuto. L'attività neuronale determina un significativo incremento del consumo di energia che può essere ripristinata solo da un proporzionale incremento del flusso locale. Valori di FEC inferiori a 20ml/10mg/min determinano cessazione dell'attività elettrica neuronale mentre al di sotto di 10ml/100mg/min si ha alterazione dell'omeostasi ionica

delle membrane. Entro 5-8 secondi dall'interruzione totale del flusso si ha un'alterazione dell'attività elettrica neuronale con paralisi funzionale dopo 2 minuti. Tuttavia il tessuto conserva la sua vitalità per 5 minuti e non mostra danni residui a seguito del ripristino della circolazione; oltre tale periodo inizia la necrosi, con fuoriuscita di K^+ dal neurone e ingresso massivo di Ca^{++} che attiva gli enzimi proteolitici (Clark and Sokoloff, 1999). Alterazioni improvvise del flusso sanguigno, in particolare interruzioni in organi importanti come cuore e cervello, sono la principale causa di infarti e ictus. Inoltre, alcune delle più importanti malattie neurodegenerative, quali *Parkinson* e *Alzheimer*, sono riconducibili ad una deregolazione dell'apporto energetico ematico, in aree specifiche del cervello. E' noto che i cambiamenti nel flusso sanguigno e quindi nell'ossigenazione del cervello (emodinamica) (Riera j. et al., 2004) sono strettamente legati all'attività neuronale. Pertanto è di fondamentale importanza una diagnosi preventiva di danno cellulare e neuronale, mediante monitoraggio del flusso sanguigno per evitare danni irreversibili.

1.12 Tecniche di monitoraggio del flusso ematico cerebrale

Attualmente sono disponibili diverse metodologie volte al monitoraggio del FEC. Tra queste rientrano le tecniche elettrofisiologiche, che rilevano l'attività neuronale (implicata nella regolazione del flusso ematico locale) basandosi sulle variazioni del potenziale di membrana dei neuroni attivati. Le tecniche di visualizzazione del cervello sfruttano invece le variazioni del metabolismo energetico necessario per attivare i neuroni.

Il gradiente elettrochimico è all'origine del potenziale sinaptico e del potenziale d'azione; ed è mantenuto dalle pompe ioniche sfruttando un processo energetico ATP-dipendente. Il glucosio e l'ossigeno vengono rilasciati nel cervello attraverso la circolazione cerebrale. Grazie alla giunzione neurovascolare, si ha un rapido aumento locale del flusso sanguigno cerebrale nelle aree attive.

I moderni apparati per le neuro-immagini misurano queste variazioni del flusso sanguigno cerebrale locale e le utilizzano come indice dell'attività neurale.

La prima tecnica funzionale sviluppata è stata la tomografia ad emissione di positroni (PET). Questa procedura prevede l'utilizzo di traccianti radioattivi legati ad un composto di interesse biologico quale ad esempio un farmaco che si lega al recettore di un neurotrasmettitore. Una serie di anelli di rilevatori circonda la testa del soggetto e registra l'istante e la posizione delle emissioni gamma prodotte dal decadimento dell'isotopo nucleare mentre attraversa il cervello (Reivich M. et al., 1979).

La PET può essere utilizzata per produrre delle mappe di variazioni locali nel flusso sanguigno cerebrale (FEC o CBF). Queste misurazioni hanno portato all'individuazione delle funzioni cerebrali sensoriali, motorie e cognitive negli esseri umani. Tale tecnica presenta tuttavia diversi svantaggi, il maggiore dei quali è la necessità di iniettare un tracciante radioattivo. L'invasività della PET rappresenta un limite nel suo impiego poiché non tutti possono sottoporsi a tale esame, come per esempio bambini e donne in gravidanza; inoltre le misurazioni frequenti, con tale tecnica, sono controindicate.

In seguito è stata sviluppata una tecnica basata su principi completamente differenti, chiamata immagine di risonanza magnetica (MRI), che ha il vantaggio di non essere invasiva e di non richiedere l'uso di sostanze radioattive consentendo di sottoporre all'esame un numero più ampio di pazienti (Silva A.C. et al., 2003). La MRI può essere usata per produrre immagini molto particolareggiate delle strutture cerebrali, inoltre, recentemente è stata sviluppata un'ulteriore tecnica detta immagine di tensore di diffusione (DTI) che consente di ottenere ricostruzioni minuziose delle fibre di sostanza bianca che connettono le regioni cerebrali.

Una delle applicazioni più entusiasmanti della tecnologia MRI è il metodo chiamato immagine di risonanza magnetica funzionale (fMRI). Questa tecnica è basata sulle differenti proprietà magnetiche dell'ossiemoglobina e della desossiemoglobina nel sangue, per questo il segnale della fMRI è detto BOLD

(*blood oxygenation level dependent*). L'aumento dell'attività neuronale, determina il movimento di ioni con conseguente attivazione delle pompe che consumano energia provocando un aumento del metabolismo energetico e del consumo di ossigeno (fig. 4).

Questo porta ad un incremento dell'emoglobina deossigenata e ad un calo del segnale di magnetizzazione. Il maggior consumo di ossigeno è seguito, dopo pochi secondi, da un aumento locale del flusso sanguigno cerebrale.

Tale incremento supera quello del consumo di ossigeno; si ha dunque un aumento relativo della quantità di ossiemoglobina e, conseguentemente, dell'entità del segnale.

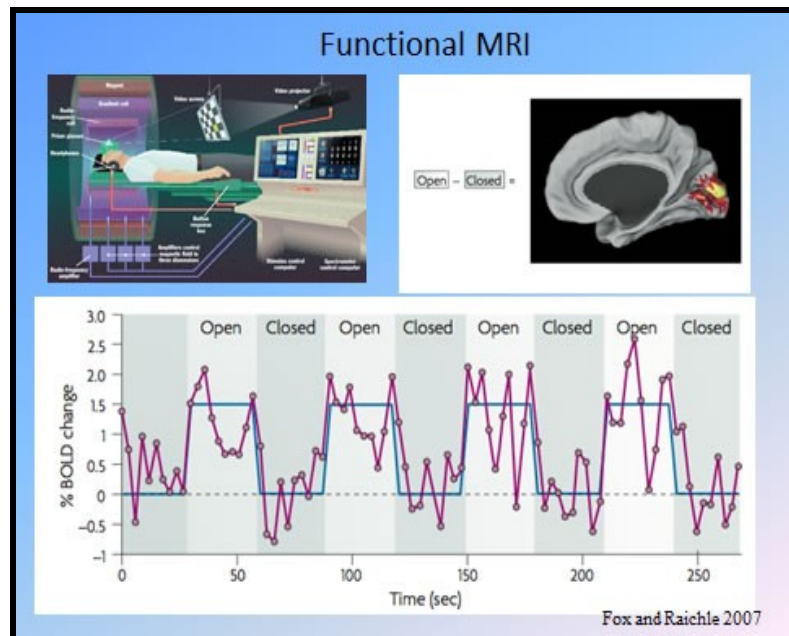


Fig.4 Immagine di risonanza magnetica funzionale.

Un'altra tecnica, utile nella comprensione del movimento del sangue all'interno dei vasi, è l'*ecodoppler* (Fig. 5) che utilizza come mezzo di contrasto naturale, il sangue, e fornisce informazioni utili circa la pervietà dei vasi.

Il principio sul quale si basa è quello della diversa intensità con la quale un raggio incidente viene riflesso da un bersaglio in movimento (effetto doppler). Le frequenze ultrasoniche utilizzate sono analoghe a quelle di una comune ecografia. Il limite di questa tecnica è rappresentato dalla necessità di

personale specializzato nell'esecuzione dell'analisi e nella lettura del referto. Inoltre, pazienti obesi o con edemi non possono essere sottoposti a questo esame a causa della difficoltà nella visualizzazione dei vasi. (Muchada R. et al., 1990).

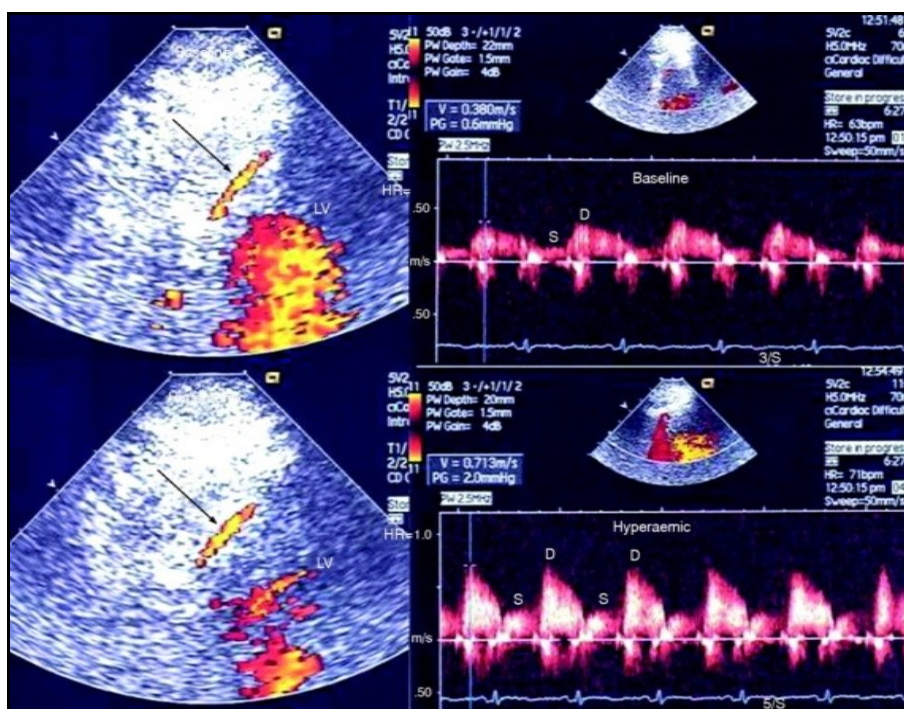


Fig.5 Immagine di un esame ottenuta mediante ecolordoppler.

1.13 Cinetica di diffusione dei gas applicata alla misurazione dei flussi ematici

L'esatto meccanismo che conduce all'aumento del FEC non è ancora chiaro anche se si ritiene che sia dovuto ad un segnale legato ad un neurotrasmettitore.

I primi tentativi di misurare la circolazione cerebrale per differenza arterovenosa di ossigeno si rivelarono errati. Infatti si comprese che questa differenza, essendo funzione sia del flusso sanguigno che del consumo di ossigeno, non era una misura valida se considerata singolarmente.

La teoria era basata sull'equazione di Fick che descrive come la variazione della concentrazione di una sostanza in un tessuto o organo, è pari alla differenza nella quantità di sostanza in entrata (arteriosa) e in uscita (venosa) moltiplicata

per il flusso di sangue e durata del flusso. Questa equazione richiede che l'organo rilasci o assorba la sostanza in questione ad un tasso costante. In realtà non esiste nessuna sostanza misurabile endogenamente che soddisfa tali criteri per il cervello. Quindi si pensò di somministrare NO (un gas allora considerato del tutto inerte) e modificare l'equazione di Fick in quanto la differenza arterovenosa in concentrazione di NO non è costante (Kety and Schmidt 1945, 1948). Probabilmente tale differenza era dovuta all'utilizzo del nitrossido da parte dell'organismo (Wink et al., 2001).

Data l'impossibilità di quantificare direttamente il gas nel cervello, tale misurazione può essere effettuata in modo indiretto sfruttando il rapporto tra la concentrazione cerebrale ed ematica del gas, considerando che questo raggiunge un valore stazionario in breve tempo. La concentrazione del gas cerebrale può essere stimata moltiplicando la concentrazione venosa del gas per la sua costante di solubilità nel cervello (Kety 1950). Monitorando il FEC, si può calcolare il consumo di ossigeno cerebrale dalla misurazione delle differenze arterovenosa nei livelli di ossigeno, secondo l'equazione :

$$VO_2 = Q(l/min) \times DAV (ml/l)$$

Dove VO_2 è il consumo di O_2 tissutale, Q è il flusso ematico e DAV è la differenza arterovenosa di O_2 .

E' evidente che il solo valore della differenza arterovenosa di O_2 , non è sufficiente per valutare uno squilibrio della domanda/offerta di O_2 , in quanto, una diminuzione di Q , comporta un incremento di DAV almeno inizialmente, mascherando pericolosamente un apporto insufficiente di ossigeno tramite il sangue (Snyder J.V. 1987, Annat G., 1986).

Sulla base di queste considerazioni, sono state sviluppate diverse tecniche che mettono in relazione le funzioni cerebrali con l'utilizzo di O_2 in condizioni fisiologiche e in numerose patologie correlate ad alterazioni dell'emodinamica. La possibilità di misurare il FEC ha consentito di correlare il consumo di

ossigeno cerebrale alla profondità dell'anestesia o coma (Wechsler et al., 1951). Ulteriori studi evidenziarono, contrariamente alle aspettative, che l'attività cerebrale durante il sonno normale viene mantenuta elevata, in quanto non vi è alcuna riduzione del consumo di ossigeno (Mangold et al., 1955). Essendo l'attività cerebrale fortemente correlata con il flusso di sangue regionale e il metabolismo per la loro misurazione venne sviluppato l'uso di traccianti radioattivi. Questi furono impiegati sugli animali, utilizzando l'autoradiografia come mezzo di rilevamento (Landau et al., 1955). Lo stesso approccio si applica allo studio del cervello umano con la progettazione di rivelatori appropriati e rivelatori esterni. Sulla base di tali principi sono state sviluppate le moderne tecniche di monitoraggio del flusso ematico e dell'attività neuronale come la tomografia a emissione di positroni (PET) e la tomografia computerizzata a emissione di singolo fotone (SPECT) e la risonanza magnetica funzionale (fMRI), in cui il tracciante è costituito sia da un agente paramagnetico somministrato per via esogena, sia dai livelli endogeni di deossiemoglobina (paramagnetica). Entrambi i parametri influenzano il campo magnetico locale cambiando il segnale MR in funzione delle variazioni locali del volume di sangue e del flusso. I metodi sviluppati da Seymour Kety continuano ad essere la base della neuroimaging umana. Tuttavia necessitano di apparecchiature piuttosto costose, personale altamente specializzato, non consentono il monitoraggio continuo del paziente e alcune sono piuttosto invasive.

1.14 Tecnica della clearance di idrogeno

Il flusso ematico locale è comunemente misurato usando il metodo della *clearance* dell'idrogeno, introdotto 30 anni fa (Aukland et al., 1964; Auckland, 1965). Il gas H₂ viene somministrato per inalazione, e quando questa viene sospesa, la sua velocità di *clearance* (proporzionale al flusso ematico locale) viene monitorata amperometricamente mediante un microelettrodo generalmente di platino (Pt).

Dati sperimentali supportano che i livelli del gas inalato, sono gli stessi sia nel sangue che nel tessuto monitorato per via elettrochimica. Quindi si raggiunge istantaneamente un equilibrio di diffusione dell' H_2 tra il sangue e il tessuto. Questo consente di calcolare il flusso ematico locale per unità di volume di tessuto (legge di Fick) attraverso la velocità di desaturazione del tessuto, quando la concentrazione arteriosa del gas scende a zero.

Questo metodo consente misurazioni continue del flusso ematico locale senza accesso arterioso o venoso. Inoltre, utilizzando le curve di desaturazione venosa si possono ottenere informazioni sull'entità e la distribuzione del flusso ematico regionale.

Attraverso l'impianto di un piccolo elettrodo semplice ed economico, si possono effettuare misurazioni simultanee da ogni tessuto. L'idrogeno viene fatto inalare all'animale direttamente o mediante la saturazione di una cameretta nel quale viene introdotto per l'esperimento. Questa operazione spesso necessita dell'anestesia. Un'alternativa alla misurazione della *clearance* del tessuto è misurare le variazioni nella concentrazione di una sostanza dispensata al tessuto dal flusso sanguigno. Il substrato più importante per il metabolismo energetico rilasciato dal flusso sanguigno è l' O_2 . Tuttavia, la concentrazione tissutale è determinata dall'equilibrio tra l'offerta e l'utilizzo. Studi effettuati con diverse tecniche hanno dimostrato che durante l'attivazione neuronale si ha un aumento nella concentrazione di O_2 locale a causa di un aumento maggiore del FEC rispetto all'utilizzo O_2 (Leniger-Follert e Lübbers, 1976; Young, 1980).

La misurazione voltammetrica di O_2 cerebrale con un elettrodo al carbonio può essere utilizzata come indice di aumento del FEC, quando l'apporto di O_2 dal sangue ha un incremento sostanziale rispetto al suo utilizzo. Quindi, le correnti di O_2 misurate nel tessuto, sono riconducibili alla variazione del FEC soltanto quando l'incremento del flusso ematico supera l'utilizzo di ossigeno. Ne consegue, che il rilevamento di un incremento di O_2 tissutale non

corrisposta da un aumento della *clearance* di H₂ può riferirsi ad un parziale inutilizzo dell'ossigeno fornito dal sangue (Lowry, Fillenz 1997).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Lo studio del metabolismo energetico cellulare, è fondamentale per la comprensione dei meccanismi fisiologici che regolano il corretto funzionamento dell'organismo.

L'ossigeno, così come il flusso ematico, svolge un ruolo centrale nel mantenimento dello stato di salute di cellule, tessuti e organi di un individuo nel suo complesso.

Il corretto metabolismo ossidativo dei substrati energetici è importante per evitare uno squilibrio tra sistema antiossidante endogeno e agenti proossidanti generati dalla parziale riduzione dell'ossigeno in condizioni patologiche.

Interruzioni brusche dell'apporto di O₂ attraverso il sangue, in aree come cuore e cervello, danno luogo ad infarti ed ictus. Inoltre alcune tra le patologie neurodegenerative più importanti, come *Parkinson* e *Alzheimer*, possono essere riconducibili ad alterazioni dell'apporto energetico attraverso il sangue in precise aree cerebrali.

Lo scopo della tesi è stato quello di riprodurre *in vitro*, un ambiente biologico dinamico che desse la possibilità di studiare il metabolismo energetico del sistema nervoso centrale (SNC), discriminando, in tempo reale, una variazione del consumo di O₂, da una variazione del flusso ematico. Il dispositivo progettato consente l'intervento dall'esterno mediante somministrazione di farmaci e il monitoraggio del loro effetto, sul metabolismo energetico cellulare. Inoltre, mediante la presenza di un microelettrolizzatore, capace di produrre *in situ* i gas H₂ e O₂ mediante elettrolisi, è possibile modulare la disponibilità di O₂ extracellulare ed effettuare importanti studi su modelli di ischemia-riperfusion (IR).

Infine, attraverso una sonda microdialitica, inserita nel comparto cellulare del dispositivo, è possibile raccogliere campioni per effettuare ulteriori analisi sul microdializzato.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti e soluzioni

Tutte le sostanze chimiche utilizzate sono state acquistate dalla Sigma-Aldrich (Milano) e sono state sciolte negli opportuni solventi e usate per gli esperimenti dopo 24h. La soluzione di tampone fosfato (PBS) a pH 7.4 è stata preparata con la seguente composizione (espressa in g/l): NaCl 8,9, NaOH 1.76 e Na₂HPO₄ 6,89. L'aggiunta di glucosio 10mM è stata fatta per preparare il PBS utilizzato per l'esperimento con le cellule. La soluzione utilizzata per effettuare l'elettrolisi dell'acqua è stata preparata a pH 7.4 con gli stessi componenti del PBS, eccezion fatta per la assenza di NaCl. Il Nafion® è stato utilizzato come fornito dal produttore (5% in una miscela di alcoli alifatici e acqua). L'elettrodeposizione di nanoparticelle di platino sulla superficie attiva dell'elettrodo di lavoro è stata eseguita utilizzando una soluzione 5 mM di acido esacloroplatinico esaidrato in acido solforico 0,5 M. La soluzione di MPP⁺ 10 mM è stata preparata in PBS glucosato poco prima della somministrazione alla coltura cellulare. Gli analiti in fase gassosa come O₂, H₂ e N₂ (purezza >99.9%), necessari alla caratterizzazione dei microsensori, sono stati forniti dalla Sapio s.r.l. Special Gases Division (Caponago, Italy).

3.2 Costruzione dell'elettrolizzatore

E' stato possibile produrre idrogeno e ossigeno gassosi mediante un sistema per elettrolisi portatile alimentato a batteria progettato e costruito integralmente nel laboratorio di elettrochimica dell'Università Politecnica di Timisoara (fig.6).



Fig.6 elettrolizzatore costruito nel laboratorio di elettrochimica di Timisoara

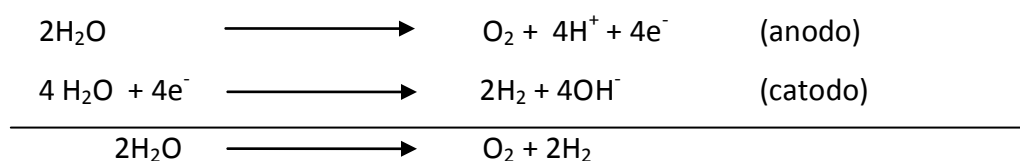
Tale dispositivo è stato successivamente miniaturizzato per poter costruire il dispositivo necessario per effettuare gli esperimenti su colture cellulari.

Il dispositivo progettato sfrutta il processo di elettrolisi dell'acqua, che, se sottoposta ad una opportuna differenza di potenziale (ddp), è in grado di dissociarsi in ioni quali H_3O^+ e OH^- , i quali vengono trasformati, rispettivamente, in O_2 , attraverso un processo di tipo ossidativo, e in H_2 , attraverso un processo di tipo riduttivo. La reazione viene condotta in una soluzione elettrolitica necessaria per incrementare la conduttività dell'acqua e si verifica sulla superficie di due elettrodi di platino/iridio (lunghezza 4 cm; 125 μm di diametro).

La d.d.p. utilizzata viene generata da una pila da 9 V il cui polo positivo viene collegato (mediante una porzione di rame rivestito da guaina isolante) con

l'elettrodo di Pt che funge da anodo, mentre il polo negativo viene collegato al secondo elettrodo di platino che funge da catodo.

Sulla superficie dell'elettrodo collegato al capo positivo della pila (anodo) si formerà l'O₂, mentre sull'altro (catodo) verrà generato H₂ secondo le seguenti reazioni:



Dalla somma delle semireazioni elettrolitiche si deduce che per ogni mole di ossigeno si formano due moli di idrogeno in accordo con la legge di Avogadro. I due gas prodotti vengono convogliati all'esterno dell'apparecchio mediante due tubicini in gomma del diametro di 1mm posti all'estremità superiore dell'elettrolizzatore.

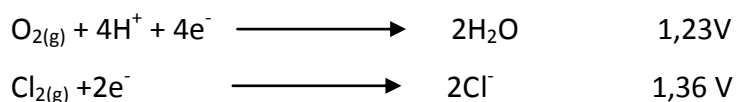
La soluzione salina utilizzata per l'elettrolisi, contiene anche idrossido di sodio (NaOH 1,76 g/l) il quale partecipa alla reazione di riduzione al catodo in misura maggiore della molecola di acqua favorendo la produzione di O₂ già a ddp relativamente più basse.

La geometria del dispositivo permette la comunicazione delle soluzioni elettrolitiche in cui sono immersi i due elettrodi ma non permette la mescolanza dei gas, i quali invece salgono separatamente verso l'alto del dispositivo e che quindi possono essere convogliati, mediante il tubicino, all'interno di una cella elettrochimica e ivi quantificati per via amperometrica.

Le soluzioni dei gas utilizzate per le calibrazioni dei sensori, sono state preparate facendo gorgogliare ciascun gas puro in una soluzione di PBS preparato eliminando NaCl, fino a saturazione, così da poter conoscere

esattamente le concentrazioni dei gas disciolti nelle soluzioni, essendo noti i rispettivi valori di solubilità a temperatura costante.

La scelta di eliminare il sodio cloruro dalla soluzione di elettrolisi deriva dalla stretta vicinanza tra il potenziale redox dell'ossigeno e del cloro :



In soluzioni contenenti elevate concentrazioni di NaCl il cloro gassoso prodotto sarebbe diventato un importante interferente del sistema elettrochimico sviluppato.

L'idea di effettuare l'elettrolisi in una soluzione tamponata a pH fisiologico, consente di produrre in situ, in eventuali modelli biologici, i gas oggetto di misurazione.

Il dispositivo così progettato e testato è stato adattato per il suo utilizzo su modelli sperimentali, quali, ad esempio, colture cellulari.

Le modifiche apportate, come verrà spiegato nella sezione 3.16, consentono la separazione fisica della cella elettrolitica, in cui vengono prodotti O₂ e H₂, dalla cella elettrochimica nella quale sono alloggiati gli elettrodi di lavoro, di riferimento ed ausiliario, e nella quale verrà caricata la sospensione cellulare. Un filtro di natura idrofobica in polietilene ultra-puro ad elevata densità, consente il passaggio dei gas generati per elettrolisi ma non il mescolamento dei liquidi tra le due celle.

3.3 Tecniche voltammetriche

Le tecniche elettrochimiche consentono il rilevamento qualitativo e quantitativo degli analiti in soluzione, in base allo stato ossidativo della molecola di interesse. Le

tecniche elettroanalitiche più importanti sono di tipo voltammetrico, tra queste annoveriamo la voltammetria ciclica, l'amperometria, la potenziometria, l'elettroforesi e la coulometria.

La grandezza fisica oggetto di analisi è di tipo elettrico (potenziale, corrente, resistenza elettrica, carica elettrica o grandezze da queste derivate). Nella voltammetria ciclica, viene applicata una rampa lineare di potenziali ad uno specifico elettrodo chiamato elettrodo di lavoro (WE), sul quale avviene un processo di ossidoriduzione che coinvolge direttamente l'analita (a patto che esso sia elettroattivo), oppure una specie ad esso stechiometricamente riconducibile (come avviene nel caso dei biosensori). All'elettrodo di lavoro viene applicata una ddp rispetto ad un elettrodo chiamato elettrodo di riferimento (RE). Gli elettrodi di lavoro possono differire per natura chimica, forma e dimensione. Generalmente sono costituiti da metalli (Pt, Au, Hg, Ag) o da materiali non metallici (come il carbonio nelle varie sue forme allotropiche conduttive). Le geometrie più comunemente utilizzate sono quelle cilindriche, a disco o a bande, mentre le dimensioni possono variare da qualche mm sino ad alcune decine di nm.

Di grande importanza è anche la dimensione dell'elettrodo, capace di modulare il meccanismo diffusivo di trasporto di materia all'elettrodo. L'utilizzo di elettrodi di piccole dimensioni (pari o inferiori a qualche decina di micron) offre alcuni vantaggi ma anche degli svantaggi. Un sensore dalla superficie attiva ridotta ottimizza la diffusione del trasportato di materia (diffusione sferica). Perciò a parità di concentrazione, la densità di corrente che fluisce sui microelettrodi è più alta di quella che fluisce su elettrodi di dimensioni maggiori, conferendo una sensibilità analitica superiore. Inoltre, utilizzando elettrodi di piccole dimensioni, possono essere impiegati solventi convenzionali in assenza di elettroliti di supporto. I macroelettrodi necessitano invece degli elettroliti di supporto per ridurre l'effetto del trasporto di materia dovuto alla migrazione dell'analita, che si sommerebbe alla corrente faradica dovuta alla

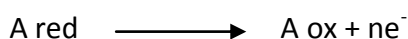
diffusione. Inoltre, i valori assoluti di corrente circolante sono decisamente minori, determinando bassi valori di caduta ohmica, e quindi evitando la necessità di compensazione se si lavora a bassa velocità di scansione del potenziale. Tuttavia, operare con microelettrodi obbliga l'adozione di dispositivi quali gabbie di Faraday in grado di schermare l'interazione degli elettrodi con campi elettromagnetici, e prevede l'impiego di sistemi elettrochimici dotati di estrema sensibilità (o di amplificatori di corrente). I microelettrodi inoltre non sono facilmente reperibili né di semplice realizzazione. Tra le applicazioni più importanti e diffuse della voltammetria rientra sicuramente la determinazione qualitativa e quantitativa di specie chimiche in soluzione che abbiano la possibilità di essere ossidate o ridotte.

Il principio su cui si basa la voltammetria può essere compreso ipotizzando di avere un elettrodo di lavoro immerso in una soluzione contenente una specie elettroattiva Aox, in grado di ridursi (ovvero di acquisire elettroni da parte dell'elettrodo di lavoro) in base alla reazione:



All'elettrodo di lavoro, viene imposto un potenziale nettamente più negativo, (ovvero più riducente) del potenziale di riduzione della specie oggetto di analisi.

Perché avvenga il passaggio di corrente attraverso l'elettrodo è necessario che la specie ossidata Aox, raggiunga l'elettrodo polarizzato e che la stessa accetti elettroni da quest'ultimo. La velocità con cui la specie chimica arriva all'elettrodo (diffusione) e la velocità di scambio degli elettroni tra elettrodo e soluzione, sono i due fattori cinetici che governano il passaggio di elettroni in soluzione. Analogamente, una specie in soluzione, capace di ossidarsi (sulla superficie dell'elettrodo di lavoro), ai potenziali applicati, cederebbe elettroni secondo la reazione :



3.4 Cella elettrochimica

La cella elettrochimica è la parte del sistema elettrochimico in cui avvengono le reazioni di ossidoriduzione. Essa è costituita da un contenitore di materiale inerte, spesso vetro o teflon nel quale sono immersi i tre elettrodi: WE, RE, (generalmente Ag/AgCl) e il contro elettrodo (AUX), normalmente costituito da un metallo che abbia una ampia superficie di scambio. Generalmente la cella elettrochimica è un sistema a tenuta di gas che consente l'alloggiamento degli elettrodi e dei dispositivi per il degassamento, nonché di un sistema di agitazione elettromagnetica. Le tecniche a potenziale controllato utilizzate nel presente studio sono la tecnica elettrochimica della voltammetria ciclica, dell'amperometria a potenziale costante e della cronoamperometria.

3.5 Nanostrutturazione dei micro sensori

Allo scopo di incrementare la sensibilità dei microsensori, nei confronti degli analiti considerati in questi esperimenti (H_2 e O_2), si è voluto sfruttare le proprietà tipiche dei nanomateriali, modificando le superfici degli elettrodi in grafite arricchendole di carbonanotubi.

Con il termine "nanotecnologie" si indica un approccio multidisciplinare volto alla realizzazione di materiali, dispositivi e sistemi nei quali almeno una delle tre dimensioni caratteristiche dei loro componenti è misurata sulla scala dei nanometri (nm).

Numerosi materiali mutano le loro proprietà fisiche se miniaturizzati, infatti le nanoparticelle traggono vantaggio dal loro drastico aumento dell'area di superficie in rapporto al ridotto volume.

L'atomo di carbonio comprende quattro forme allotropiche costituite tutte da diverse disposizioni dei legami chimici tra gli atomi di carbonio che compongono i grafeni: grafite, diamante, fullerene, nanotubi di carbonio, questi ultimi, su cui si è concentrato il presente lavoro, possono essere singoli o

concentrici chiamati rispettivamente *single walled carbonanotubes* (SWCN) e *multi walled carbonanotubes* (MWCNT).

I carbonanotubi vengono costruiti con un rapporto lunghezza/diametro fino a 132.000.000:1 (Jiao et al., 2009), valore significativamente maggiore rispetto a qualsiasi altro materiale. La biocompatibilità di questi composti, e il loro utilizzo nel campo delle neuroscienze, sono attualmente argomento di studio (Hua 2013). Nella figura 7 è mostrata un immagine del microsensore nanostrutturato con l'ingrandimento della superficie dei carbonano tubi vista al SEM.

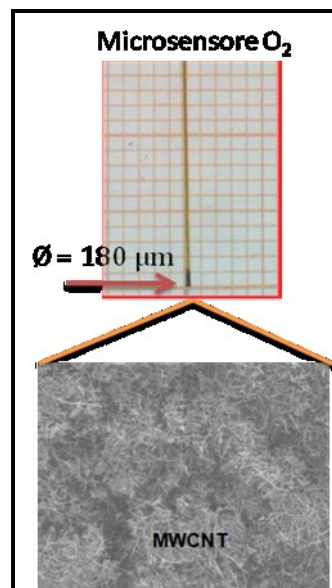


Fig.7 Immagine microsensore nanostrutturato con ingrandimento al SEM della superficie ricoperta di CNT.

Le nanoparticelle si prestano a svariate applicazioni, dal campo biomedico a quello chimico, energetico, elettrochimico. Le nanostrutture di carbonio sono interessanti dal punto di vista elettrochimico in virtù anche delle spiccata conduttività elettrica che le caratterizza.

Altre caratteristiche che contraddistinguono le specie nanostrutturate del carbonio sono l'elevata resistenza alla trazione, alla flessione e alle alte temperature, risultano inoltre, poco solubili in acqua dove tendono ad aggregare. Il notevole vantaggio che si ottiene nel passaggio di

miniaturizzazione del materiale, “*nano on micro*” rende queste strutture adatte per utilizzo come trasduttori di segnali elettrochimici (Qureshi et al., 2009).

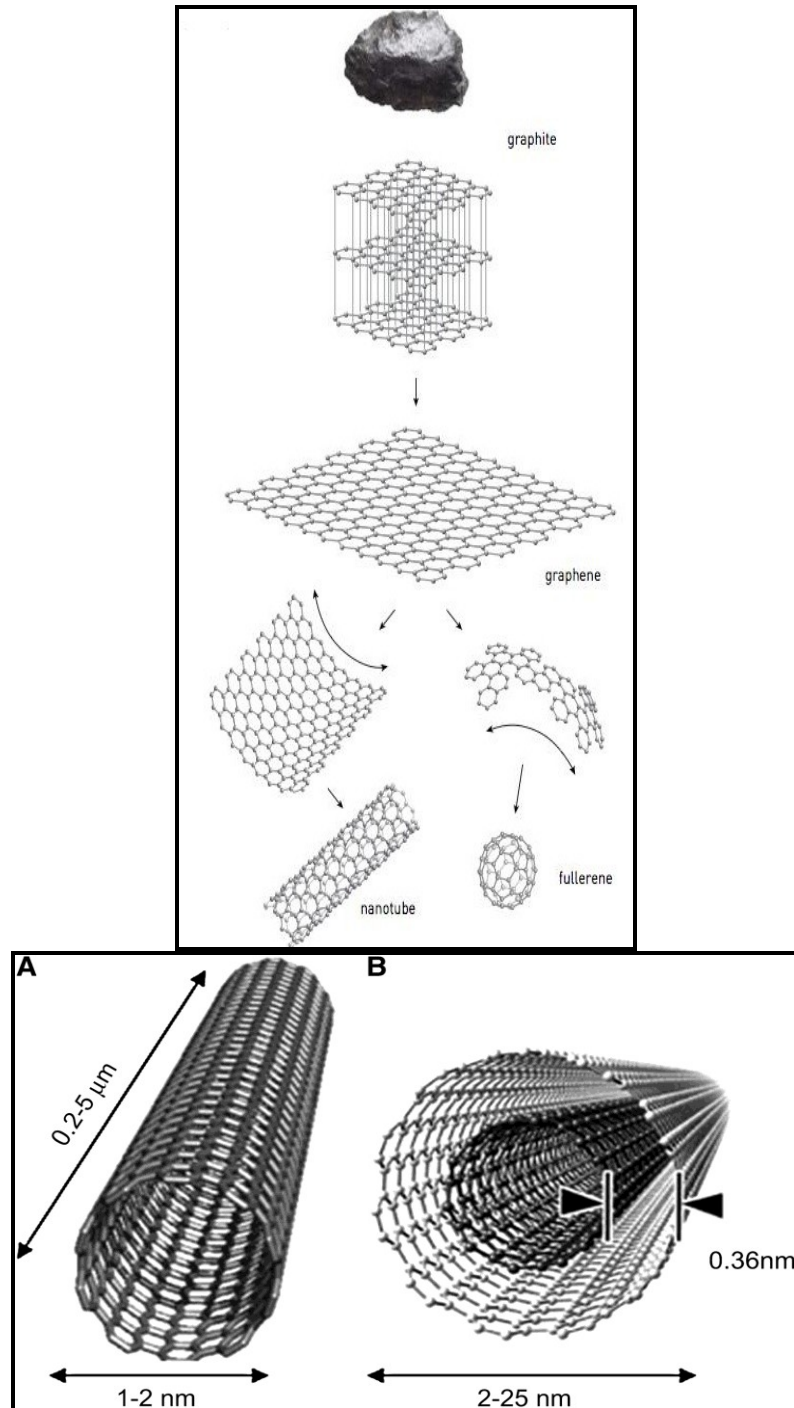


Fig.8 rappresentazioni delle strutture allotropiche del carbonio e dei carbonanotubi

3.6 Costruzione e calibrazione del sensore per l'ossigeno

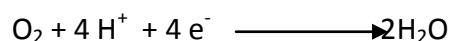
I microsensori per l'ossigeno sono stati preparati a partire da fili d'argento ricoperti di Teflon (lunghezza 30 mm; d.i. = 125 μm , Advent Research Materials, Suffolk, U.K.), modificando una procedura precedentemente descritta (Bazzu G., et al., 2009).

Brevemente, 1 mm di filo di argento, necessario per garantire un buon contatto elettrico, viene privato del teflon inserito in una porzione di tubo capillare siliceo (lunghezza 10 mm; i.d. 180 μm , Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) e parzialmente riempito con una resina epossidica caricata al carbonio (55% w/w) (Araldite-M, Sigma-Aldrich, Milano) ottenuta miscelando 850 mg di grafite, con 250 mg di araldite-M e 200 mg di indurente. E' stato così ottenuto preliminarmente un elettrodo circolare avente l'area di superficie pari a $2.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$. Il diametro del sensore è di circa 180 μm , valore superiore alla grandezza di un capillare sanguigno (< 100 μm) (Silver 1965): tale requisito rende ottimale l'impiego *in vivo* di tale dispositivo. Infatti la misurazione dei livelli tissutali di ossigeno, con sensori di queste dimensioni, previene le variazioni che invece si potrebbero avere utilizzando sensori più piccoli, a causa della differente risposta in dipendenza dell'orientazione degli stessi all'interno dei capillari (Bolger 2006). La novità nella costruzione microsensore per l'ossigeno prevede l'aggiunta, sulla superficie della resina epossidica caricata al carbonio non ancora solidificata, di nano particelle di carbonio quali i carbonanotubi (CNT) mediante immersione e successivo essiccamento in stufa per 24 h a 30°C.

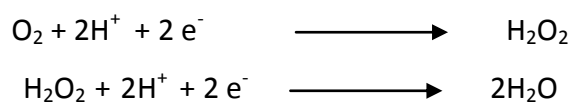
La deposizione dei carbonanotubi sulla superficie del trasduttore risulta in un notevole incremento della superficie elettroattiva e così contribuisce ad aumentare la corrente di base del sensore (come verrà descritto nella sezione 4.1).

Inoltre, la quantità di carbonanotubi depositati sulla superficie di grafite, determina le dimensioni della superficie attiva catalizzante in maniera dose dipendente.

La riduzione elettrochimica dell'ossigeno, consiste in un complesso processo, che avviene sulla superficie del trasduttore, secondo due differenti meccanismi. Il primo si verifica in un unico passaggio, senza la produzione di intermedi rilevabili elettrochimicamente, secondo il seguente schema:



Il secondo avviene mediante due passaggi che prevedono la formazione di un intermedio rilevabile, il perossido d'idrogeno, e la successiva riduzione di questo ad acqua.



La figura 9 mostra il voltammogramma relativo ad un micro sensore per l'O₂ e riporta la corrente misurata in PBS in presenza di azoto (tracciato nero) e ossigeno (tracciato rosso). (La CV è stata eseguita utilizzando una velocità di scansione di 100mV/s in un range tra -1 e + 0.25V). La riduzione dell'ossigeno inizia ad un potenziale di -230 mV, con un picco massimo a -700 mV: tale potenziale è stato applicato agli elettrodi per le calibrazioni e gli esperimenti su modelli cellulari.

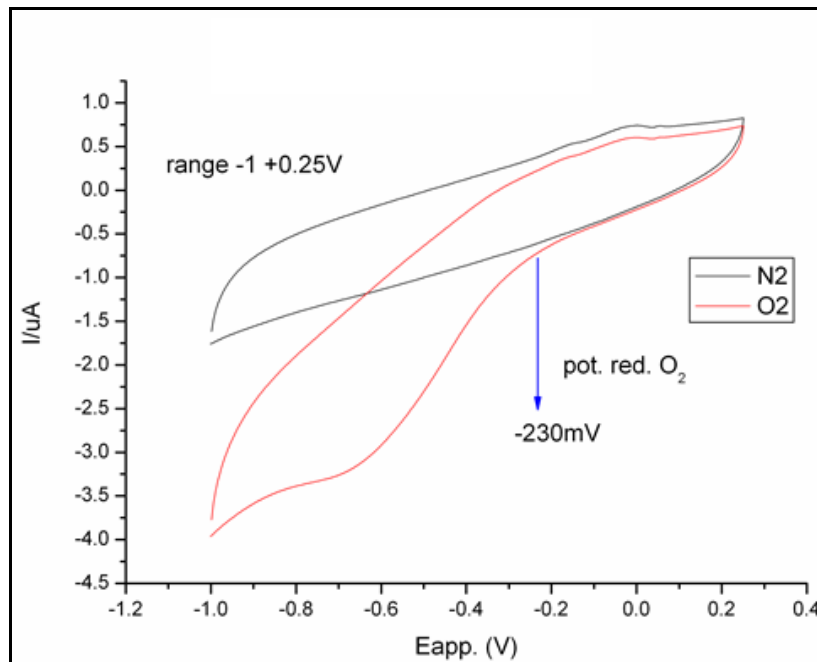


Fig. 9: CV eseguita sul microsensore per l'ossigeno in presenza di N₂ (tracciato nero) e di O₂ (tracciato rosso)

La calibrazione del microsensore per l'ossigeno è stata eseguita tramite l'ausilio della tecnica dell'amperometria a potenziale costante. Il microsensore è stato immerso in un volume di 10 ml di PBS saturato con azoto (PBS / 0% O₂) e ad esso è stata applicata una differenza di potenziale di -700 mV. Una volta polarizzato il sensore ed ottenuta una linea di base stabile, sono state eseguite 5 successive iniezioni (+200, +204, +208, +212, e +216 μ l) di una soluzione madre saturata con ossigeno gassoso puro (1,25 mM) per ottenere un range di concentrazioni nella cella elettrochimica compreso tra 0 e 125 μ M.

3.7 Costruzione del sensore per l'idrogeno

L'elettrodo comunemente utilizzato per il monitoraggio dell'idrogeno in generale è costituito da un filo di platino e iridio (Pt/Ir 90:10), in virtù delle proprietà catalitiche che caratterizzano questo metallo nobile (Lowry, and Fillenz 2001).

La costruzione dell'elettrodo utilizza la stessa metodica impiegata per la costruzione del sensore per l'ossigeno (vedi sez. 3.6). La superficie del trasduttore arricchita con CNT di per sé non ha le proprietà catalitiche necessarie per poter ossidare l'idrogeno (come mostrato nei tracciati delle fig 10A e 10B).

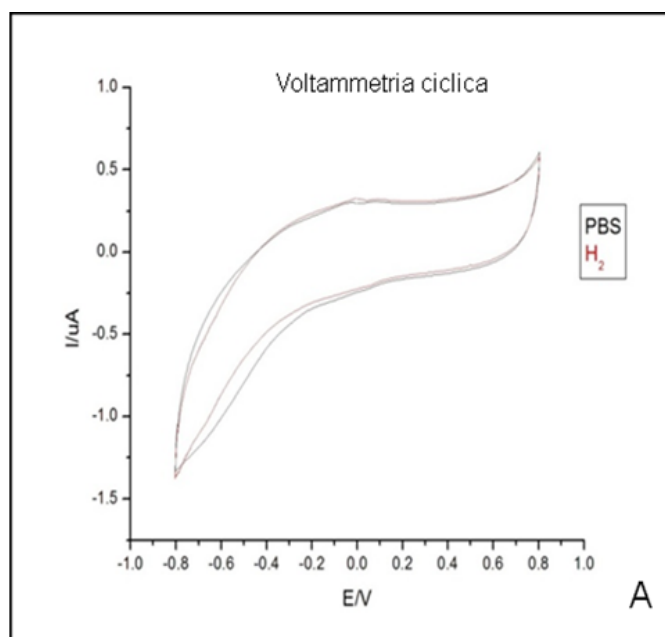


Fig. 10A CV in PBS +H₂ del microsensore in epoxy/CNT.

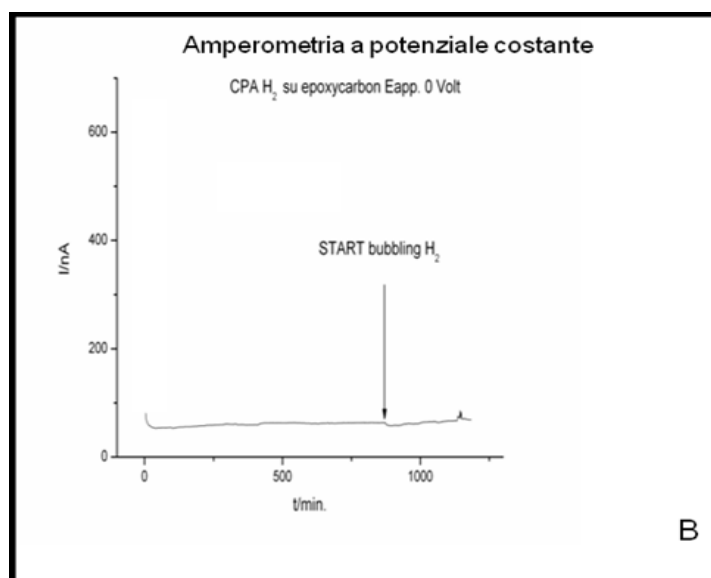


Fig 10B il sensore così strutturato, utilizzato nel monitoraggio dell'ossigeno, non e' capace di ossidare l'idrogeno. Esperimento svolto in CPA.

Per dotare il sensore delle caratteristiche catalitiche necessarie per il monitoraggio dell'idrogeno si è proceduto alla copertura con platino della superficie attiva tramite un processo di elettrodeposizione, mediante (i risultati dell'elettrodeposizione sono mostrati nel paragrafo 4.3, fig. 18) l'elettrolisi di una soluzione contenente acido esacloroplatinico. I parametri adottati per la deposizione dello strato di platino sulla superficie di natura carboniosa, derivano da risultati di uno studio eseguito presso i laboratori di Timisoara, tramite l'ausilio della tecnica della cronoamperometria, in cui sono stati comparati i rendimenti dell'elettrodeposizione al variare di alcuni parametri quali tempi e potenziali di riduzione applicati, concentrazione di acidoesacloroplatinico in soluzione.

I processi di elettrodeposizione delle nanoparticelle di platino sono stati condotti in una soluzione 5 mM di acido esacloroplatinico esaidrato solubilizzato in acido solforico alla concentrazione di 0,5 M.

3.8 Cenni di chimica dell' elettrodeposizione e parametri utilizzati

L'elettrodeposizione è un processo elettrochimico basato sull'elettrolisi di una soluzione contenente un composto del metallo da depositare su una superficie di diversa natura. La reazione deve avvenire all'interno di una soluzione elettrolitica, acida o alcalina, per incrementare la conducibilità. Viene utilizzata una cella elettrochimica come già descritto nella sezione XXX I parametri adottati per la deposizione dello strato di platino sulla superficie di natura carboniosa, derivano da risultati di uno studio eseguito in cronoamperometria dove sono stati comparati i rendimenti dell'elettrodeposizione a seguito delle variazioni di parametri quali: tempi e potenziali di riduzione applicati, concentrazione di acido esacloroplatinico in soluzione. La deposizione avviene sulla superficie dell'elettrodo di lavoro a seguito dell'applicazione di una ddp tra questo elettrodo e quello di riferimento. I cationi migrano verso il polo negativo (catodo) e gli anioni verso quello positivo (anodo) e si realizza il passaggio di corrente elettrica nella soluzione. A contatto con gli elettrodi avvengono

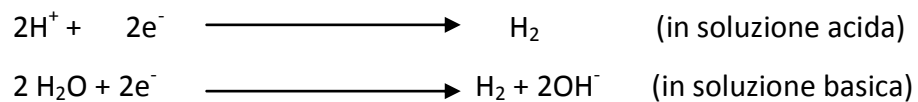
reazioni di ossido-riduzione tra gli ioni in soluzione con trasferimento di elettroni. Avviene rispettivamente, la riduzione al catodo e l'ossidazione all'anodo.

Questo processo si chiama elettrolisi e consente lo svolgimento di una reazione chimica non spontanea, mediante l'applicazione della corrente elettrica fornita dall'esterno (il processo inverso avviene in una pila). Nella cella elettrolitica gli oggetti da ricoprire sono collegati al polo negativo di una sorgente di corrente continua e costituiscono il catodo, mentre l'anodo è collegato al polo positivo e chiude il circuito elettrico. I cationi metallici liberi in soluzione si scaricano sulla superficie del catodo, ossia acquistano un numero di elettroni pari alla propria carica positiva, secondo la seguente reazione elettrochimica:



La scarica del catione metallico, con conseguente deposizione del metallo allo stato elementare cristallino, non è l'unico processo catodico possibile, poiché avviene sempre in competizione con la scarica degli ioni H^{+} , da cui si ottiene lo sviluppo di idrogeno gassoso.

In una soluzione acquosa la reazione complessiva di sviluppo di idrogeno gassoso è:



I parametri utilizzati per la deposizione delle nanoparticelle di platino sul supporto di resina epossidica caricata al carbonio sono stati evinti da lavoro pubblicato dal Duarte et al (2005) e così schematizzati:

E_1/V	t_1/s	E_2/V	t_2/s
-0.5	5	0	600

E_1/V = Primo valore di potenziale applicato E_2/V = Secondo valore di potenziale applicato

t_1/s = tempo relativo al primo potenziale t_2/s = tempo relativo al secondo potenziale

La elettrodeposizione di nanoparticelle di platino sulla superficie contenente i carbonanotubi, ha richiesto uno studio approfondito (svolto presso i laboratori di Timisoara) volto alla ottimizzazione di tutti i parametri.

Tali parametri sono stati così definiti:

E_1/V	t_1/s	E_2/V	t_2/s
-0.7	10	-0.3	100

E_1/V = Primo valore di potenziale applicato E_2/V = Secondo valore di potenziale applicato

t_1/s = tempo relativo al primo potenziale t_2/s = tempo relativo al secondo potenziale

3.9 Calibrazione del sensore per l'idrogeno

La calibrazione del microsensore per l'idrogeno è stata eseguita tramite l'ausilio della tecnica dell'amperometria a potenziale costante. Il microsensore è stato immerso in un volume di 10 ml di PBS e ad esso è stata applicata una ddp di +250 mV. Una volta polarizzato il sensore ed ottenuta una linea di base stabile, sono stati aggiunti volumi noti da (0.25 a 7,5 ml) di una soluzione madre saturata con idrogeno gassoso puro (960 μ M), per ottenere un range di concentrazioni nella cella elettrochimica compreso tra 20 e 960 μ M. La calibrazione è stata effettuata tenendo conto delle correzioni dei volumi, e il raggiungimento della concentrazione di 960 μ M è stato ottenuto mediante gorgogliamento di idrogeno puro all'interno della cella elettrochimica.

3.10 Microdialisi in vitro

La tecnica microdialitica consente il recupero o la somministrazione, di sostanze a basso peso molecolare nell'interstizio di organi o tessuti inoltre, consente di monitorare dinamicamente l'ambiente extracellulare e valutare eventuali modificazioni in risposta a stimoli esterni (Benveniste et al., 1989). La microdialisi è basata sulla separazione di due compartimenti fluidi mediante 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. Attraverso questo metodo è possibile il monitoraggio dei neurotrasmettitori e altre molecole nell'ambiente extracellulare ed è utilizzabile non solo *in vivo* ma anche *in vitro*. Questa tecnica ha subito nel corso degli anni numerose modifiche ed è attualmente largamente utilizzata per il campionamento e la quantificazione di neurotrasmettitori, neuropeptidi e ormoni nel cervello e nei tessuti periferici.

La microdialisi *in vivo* si esegue impiantando una sonda microdialitica nell'area del cervello (o di altro tessuto) che si intende monitorare; la sonda (normalmente costituita da una membrana dializzante), dotata di un ingresso (inlet) ed una uscita (outlet), viene costantemente perfusa con una opportuna soluzione (generalmente Ringer) nel lato interno mentre quello esterno è in diretto contatto con il liquido extracellulare. Mediante la microdialisi è possibile riprodurre un vaso sanguigno artificiale nel quale specie chimiche a basso peso molecolare diffondono secondo il proprio gradiente di concentrazione. Le sonde microdialitiche vengono comunemente utilizzate, negli esperimenti in vivo, su animali anestetizzati o freely-moving; mentre negli studi in vitro, viene adottata una variante che consiste nella costruzione di un capillare microdialitico (Migheli et al., 2008).

Attraverso l'inlet possono essere somministrati diversi farmaci mentre dall'outlet, il fluido contenente le molecole di interesse può essere recuperato ed analizzato tramite diverse tecniche analitiche. La quantità delle molecole

recuperate è in funzione del recovery che viene identificato dal rapporto fra la concentrazione delle sostanze dializzate e la concentrazione delle stesse in un medium di riferimento in cui viene posizionata la sonda. Il recovery viene influenzato da diversi fattori quali la velocità del flusso di perfusione, l'area e il cut-off della membrana dializzante (che definisce la permeabilità della membrana alle varie sostanze), il tempo di campionamento, il coefficiente di diffusione delle molecole, le interazioni delle molecole con la membrana e infine il fattore di tortuosità λ (discostamento della diffusione delle molecole da una linea retta). Queste variabili causano una sottostima del valore del recovery rispetto alle reali concentrazioni delle sostanze presenti in vivo. Si possono distinguere un recovery assoluto e un recovery relativo. Il primo (normalmente espresso in grammi) è dato dalla quantità assoluta della sostanza recuperata per unità di tempo ed è direttamente proporzionale al flusso. Il recovery relativo è invece inversamente proporzionale al flusso per unità di tempo, ed è generalmente espresso come valore percentuale (fig.11).

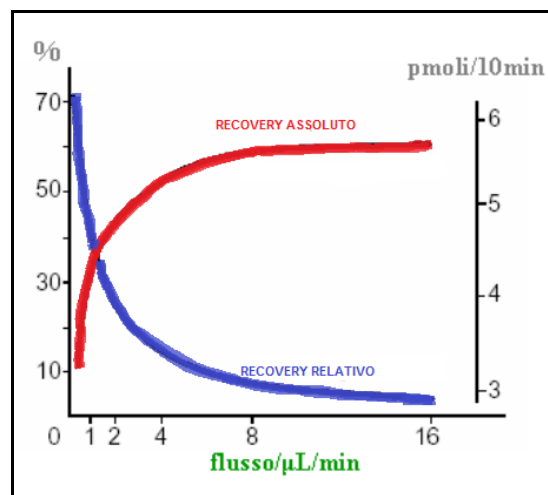


Fig. 11. Rapporto tra recovery assoluto e recovery relativo.

I vantaggi principali della tecnica della microdialisi comprendono la possibilità di un monitoraggio *in situ* dell'area sottoposta ad analisi mediante un sistema altamente specifico che consente di valutare dinamicamente le risposte ad eventuali stimoli. Tuttavia la microdialisi è caratterizzata reca in sé alcuni limiti

quali la sua invasività, all'impoverimento dell'ambiente fisiologico e ai tempi piuttosto lunghi del recupero dei campioni.

3.11 Procedure microdialitiche

Dopo aver costruito la sonda microdialitica, questa viene perfusa con PBS + glucosio 10mM utilizzando una pompa peristaltica a microinfusione a doppio canale (P720 *peristaltic pump*) ad un flusso costante di 3.0 $\mu\text{L}/\text{min}$. La pompa viene collegata all'*inlet* mediante un tubo di polietilene e dopo un periodo di stabilizzazione, nella camera microdialitica vengono caricati, $0,5 \times 10^6$ cellule/ 50 μL di sospensione di cellule PC12 mediante l'utilizzo di una siringa da 1 ml collegata al tubo di polietilene precedentemente inglobato nel dispositivo.

E' stata registrata la corrente di base dei sensori per l' H_2 e per l' O_2 per un tempo di 1h prima del caricamento delle PC12.

Quindi è stata registrata, per altri 60 minuti, la corrente in presenza delle cellule ed è stato somministrato MPP^+ alla concentrazione di 1,5 mM sempre per un tempo di 1h. In fine la sospensione cellulare è stata riperfusa con PBS glucosato.

L'esperimento si conclude con una produzione di H_2 e O_2 tramite elettrolisi per la misurazione dei tempi di clearance .

3.12 Coltura cellulare

Le cellule vengono mantenute alla temperatura di 37°C in petri disk da 60 mm (Migheli et al., 1999). Le colture delle cellule PC12 sono utilizzate in un intervallo di passaggi compreso tra il 15° e il 20° (Yuyama et al., 2001). La sospensione impiegata negli esperimenti viene preparata aspirando il medium di coltura ed effettuando due lavaggi con 5 ml di PBS arricchito di Ca^{2+} (1.2 mM), Mg^{2+} (0.54 mM), glucosio (7.5 mM) e DMEM-F12 (10%); Le PC12 vengono quindi staccate dal fondo della piastra e separate meccanicamente con una pipetta Pasteur a punta ristretta fino a renderle cellule singole. Dalla sospensione così ottenuta, viene prelevata una piccola aliquota per effettuare la conta cellulare tramite la camera di Burker e il Trypan Blue (colorante per il

saggio della vitalità cellulare).In seguito, la sospensione cellulare viene centrifugata a 94g per 5 minuti e il volume iniziale viene corretto in maniera tale da avere una concentrazione finale di cellule compresa tra 0.5 e $1.5 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$.

3.13 Vitalità delle PC12 prima e dopo gli esperimenti

La vitalità delle cellule è testata con il colorante Tripan Blue utilizzando la camera di Burker per la conta. Le cellule PC12 sono state trasferite delicatamente nel dispositivo (attraverso un tubo di caricamento) in singole cellule o in piccoli clusters. Le cellule PC12 vengono poi lasciate nella camera microdialitica per oltre 3h in condizioni di perfusione costante ($3\mu\text{l}/\text{min}$) Al termine degli esperimenti, le cellule si trovano riaggregate in grandi cluster, tuttavia non è stata osservata una significativa diminuzione della vitalità cellulare, paragonata con la mortalità iniziale (la vitalità finale è stata $95.2 \pm 3.2\%$, $p < 0.05$, $n = 25$).

3.14 Analisi statistica

La corrente di ossidazione dell' idrogeno e quella di riduzione dell'ossigeno, è espressa in nanoampere (nA) ed è data dalla media \pm errore standard, mentre la concentrazione dell' H_2 e dell' O_2 è espressa in micromoli ($\mu\text{M}/\text{l}$). Dopo le calibrazioni dei microsensori, la linea di regressione è calcolata tra la corrente di ossidazione/riduzione e le concentrazioni dei due gas iniettata.

3.15 Schema dispositivo

Lo schema del dispositivo utilizzato per lo studio, (Fig.12), si compone di diverse parti:

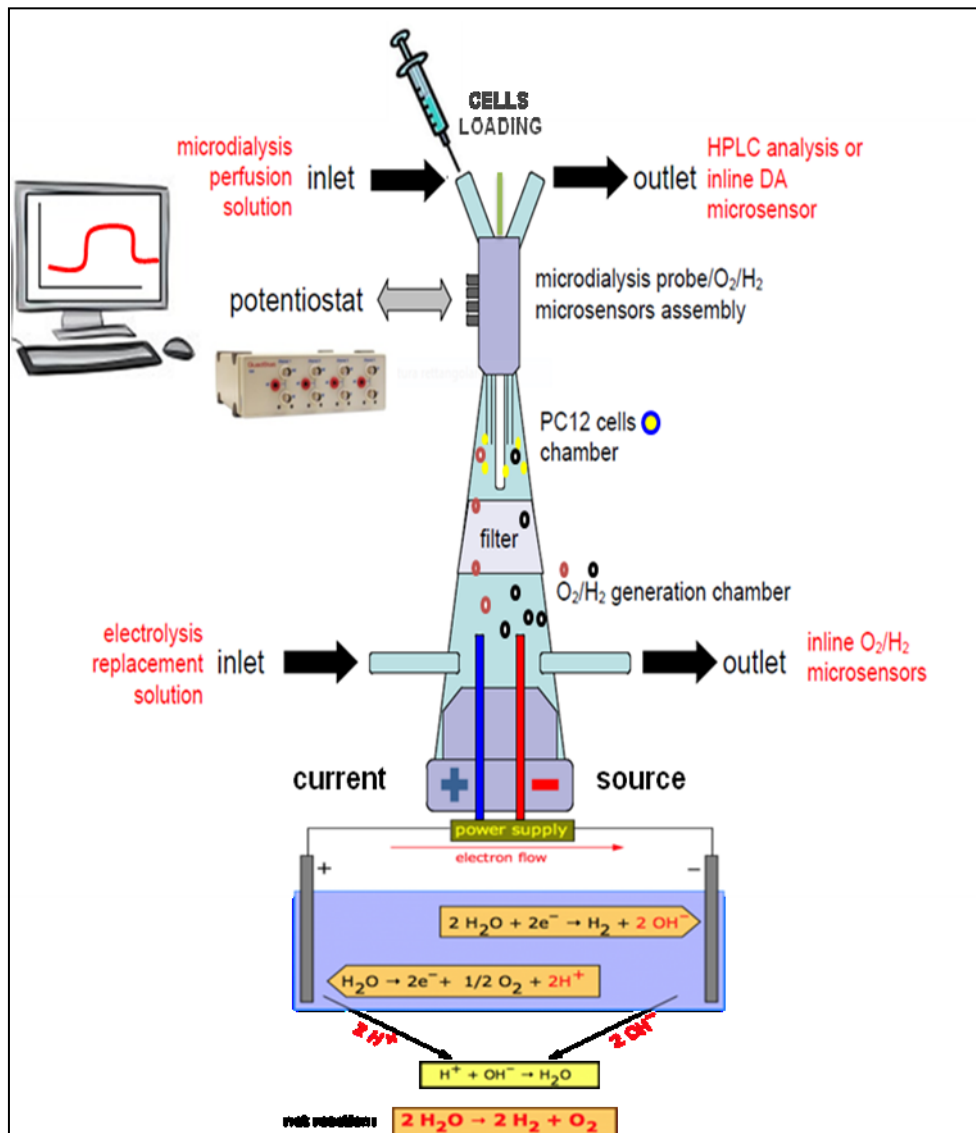


Fig.12 schema del dispositivo utilizzato per gli esperimenti

La descrizione dal basso verso l'alto trova come primo componente, il microelettrolizzatore, costruito a partire da un tappo di un ago cannula, opportunamente modificato e adattato alla nuova funzione. Su di esso sono stati inseriti due elettrodi di platino, fili di 1cm di lunghezza, ricoperti di teflon

per 0,9cm in modo da rendere attiva una superficie di 1 mm di platino nudo. Viene applicata una corrente di 9 Volt sui due elettrodi immersi in soluzione con formazione immediata dei gas idrogeno e ossigeno. Questi, vengono convogliati (attraverso un filtro idrofobico di polietilene ultrapuro), nella cameretta elettrochimica che ha un volume di 250 μ l.

All'interno della cella elettrochimica, sono presenti l'elettrodo ausiliare, costituito da un filo di platino della lunghezza di 2 cm, un elettrodo di riferimento in argento ricoperto da argento cloruro (0.5 cm) l'elettrodo di lavoro per l'ossidazione dell'idrogeno e quello per la riduzione elettrochimica dell'ossigeno. I potenziali applicati sono rispettivamente +250 mV e -700mV.

La cameretta, ospita inoltre, una sonda micro dialitica, collegata ad una pompa da microinfusione che consente un flusso regolabile e costante. Tramite la sonda è possibile sia la somministrazione di una soluzione fisiologica glucosata (per il mantenimento delle funzioni vitali delle cellule), degasata o con O₂ al 21%, sia la somministrazione di farmaci.

Il dispositivo possiede inoltre un sistema per il caricamento delle cellule.

Gli elettrodi, sono collegati al potenziostato e al registratore dei segnali derivati dalla cella.

I segnali, amplificati ed elaborati tramite un software, sono visibili in tempo reale sullo schermo di un *pc*. Nella figura 13 è riportata un'immagine del prototipo utilizzato per gli esperimenti.

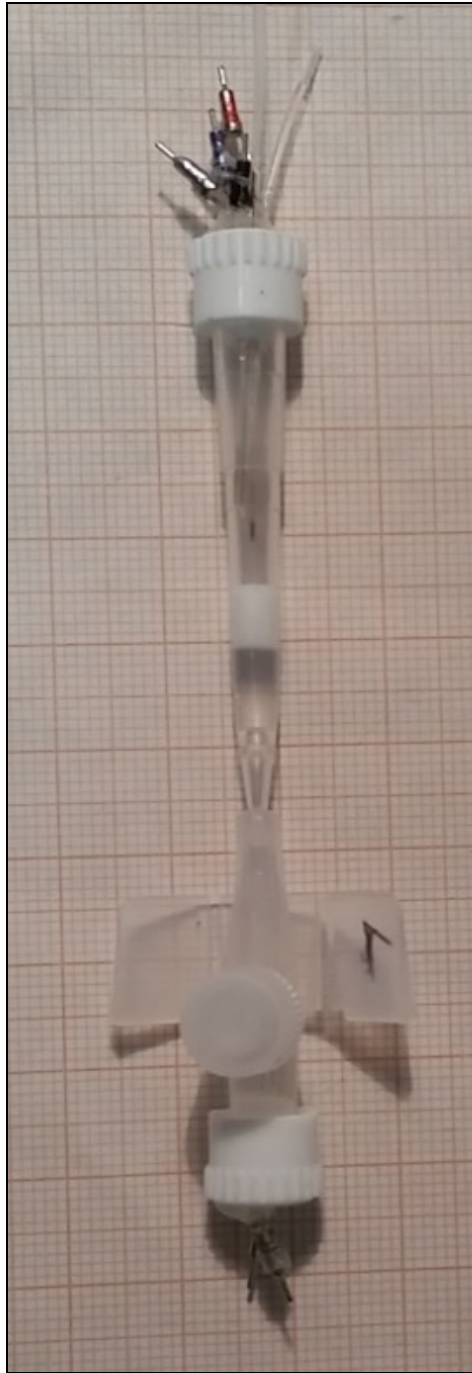


Fig. 13 prototipo utilizzato per gli esperimenti

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Microsensore per l'O₂

In figura 14 è mostrato la variazione delle correnti di *background* del microsensore in assenza e in presenza dei MWCNT. La presenza dei carbonanotubi sulla superficie del trasduttore in carbonio ha incrementato la corrente di base fino a 100 volte rispetto ai microsensori con la sola epoxy-carbon.

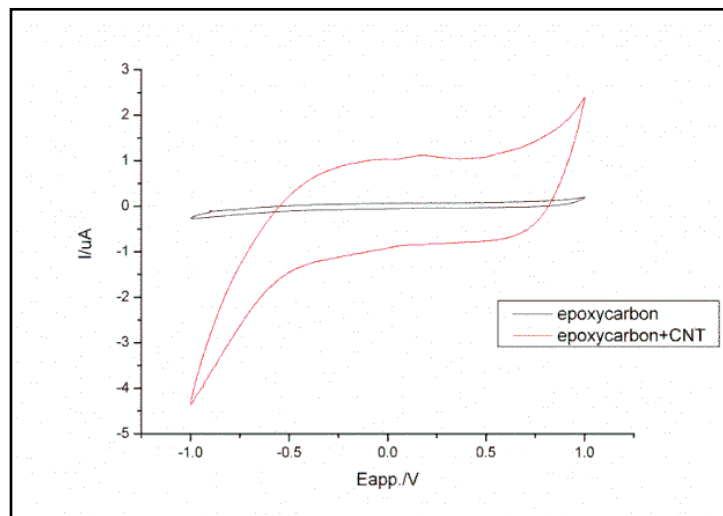


Fig.14 CV in PBS dei microsensori senza e con i CNT

Tale incremento della corrente è concentrazione-dipendente (Fig. 15).

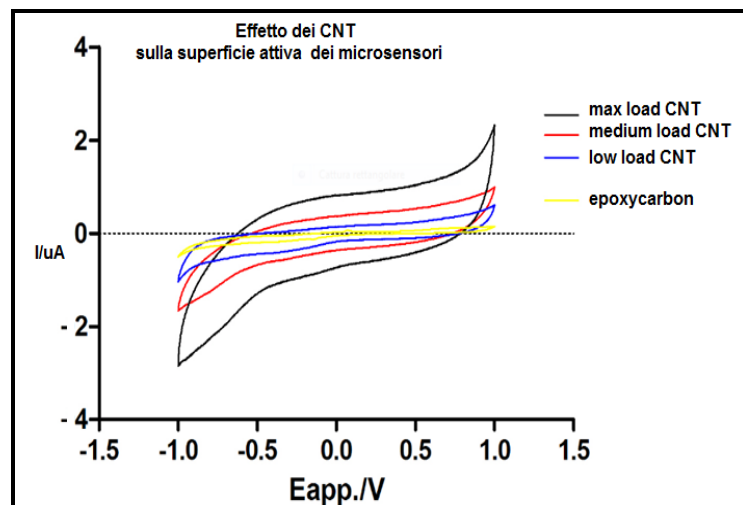


Fig. 15 Effetto dose dipendente dei CNT sulla corrente di base dei sensori: Caricamenti crescenti di CNT sulla superficie del sensore, si riflettono in valori di corrente basali maggiori.

4.2 Sensibilità del microsensore per l'O₂

Il microsensore per l'O₂ è stato calibrato come descritto nella sezione 3.6. La sensibilità del nuovo microsensore, modificato con l'aggiunta dei carbonanotubi, è risultata essere significativamente più alta rispetto ai microsensori con la sola epoxy-carbon (-222±17 pA μM⁻¹; Bazzu et al., 2009). Nella figura 16 è rappresentata una calibrazione con microsensori per l'ossigeno costruiti con differenti quantità di carbonanotubi.

Le calibrazioni di tutti i sensori hanno mostrato una ottima linearità ($r^2=0,99$; n=6) nel range di concentrazioni studiato (25-125 μM) con uno *slope* medio di -727±27 pA μM⁻¹ di O₂ per i sensori con il maggior carico di CNT, di -501±23 pA μM⁻¹ di O₂ per i sensori con un medio carico di CNT e di -349±19 pA μM⁻¹ di O₂ per i sensori con il minor carico di CNT

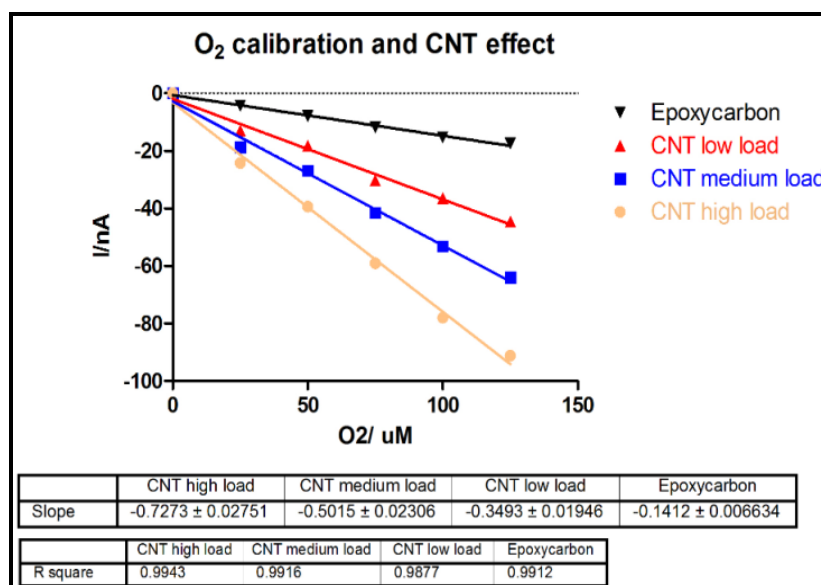


Fig. 16 Calibrazione O₂ su microsensore epoxy-carbon/CNT

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti con un caricamento medio di carbonanotubi (CNT *medium load*) (figura 17); la scelta è ricaduta su questo *design* per l'ottimo rapporto tra sensibilità e stabilità e l'alta riproducibilità nella costruzione.

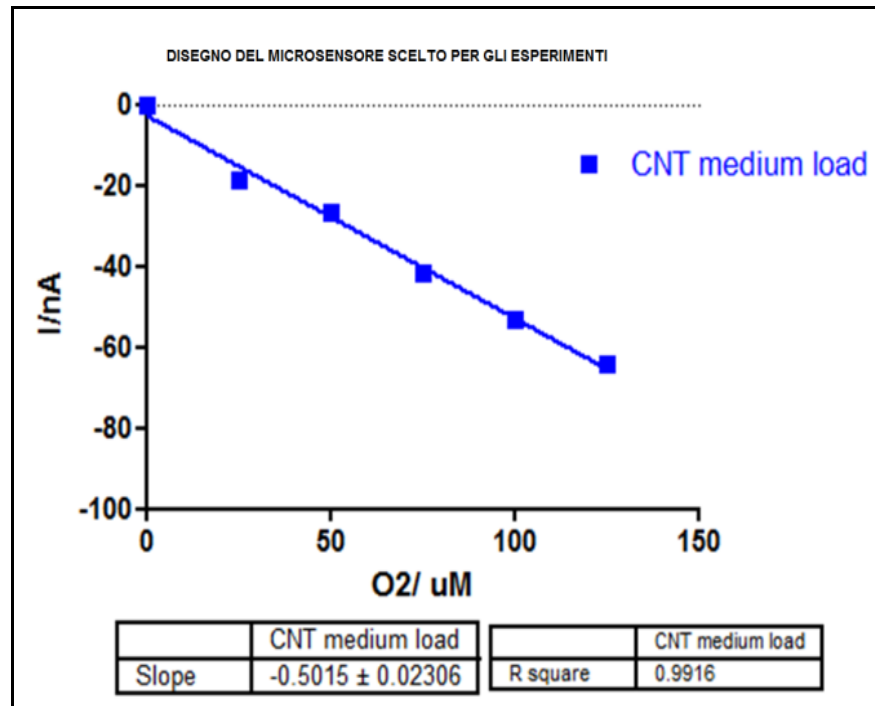


Fig. 17 calibrazione del microsensore con carico medio di CNT

Il sensore considerato ha mostrato uno slope di 0.5 nA/ μ mole e un R^2 di 0,992. Tali valori si sono ripetuti in modo stabile durante le calibrazioni eseguite nei giorni successivi alla costruzione del microsensore (dati non mostrati). Queste calibrazioni hanno consentito di determinare la concentrazione residua di O_2 presente in cella in esperimenti effettuati su colture cellulari partendo dai valori della corrente registrati (paragrafo 4.10).

4.3 Microsensore per l'H₂: platinizzazione del microsensore al carbonio

La platinizzazione del microsensore in epoxycarbon/CNT, eseguita come descritto nel paragrafo 3.8, conferisce all'elettrodo proprietà catalitiche nei confronti dell'idrogeno. Il voltammogramma relativo alla elettrodeposizione di platino sulla superficie contenente anche i carbonanotubi (fig. 18), differisce in maniera significativa da quello ottenuto sul solo supporto carbonioso (fig. 19).

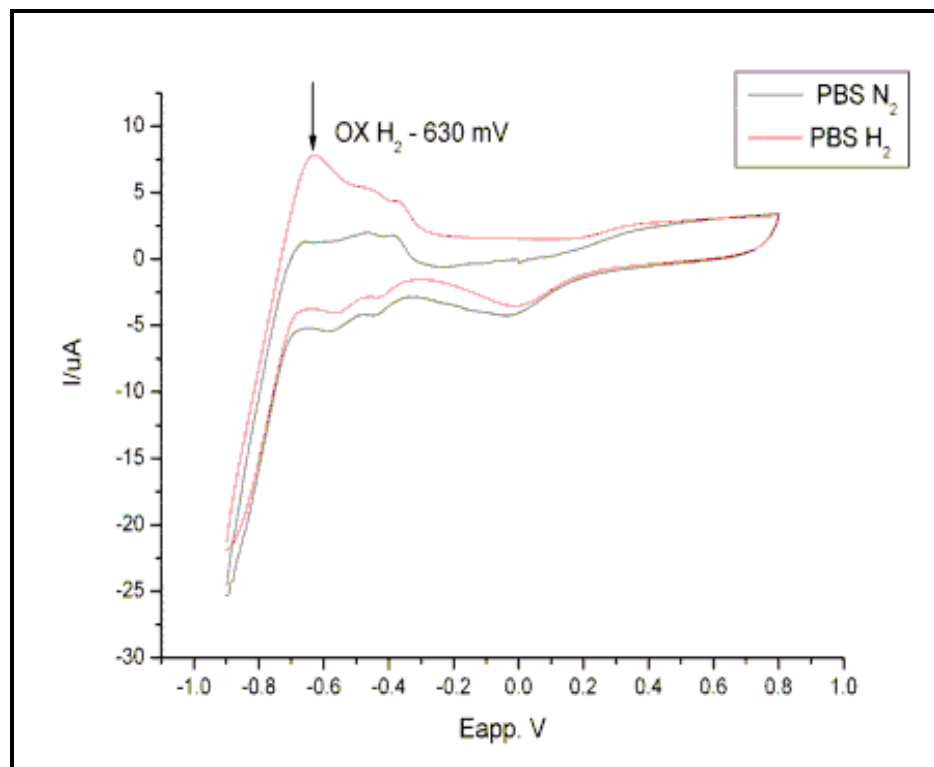


Fig. 18 CV in PBS/N₂ e inPBS/H₂ del micro sensore in epoxy/CNT/Pt

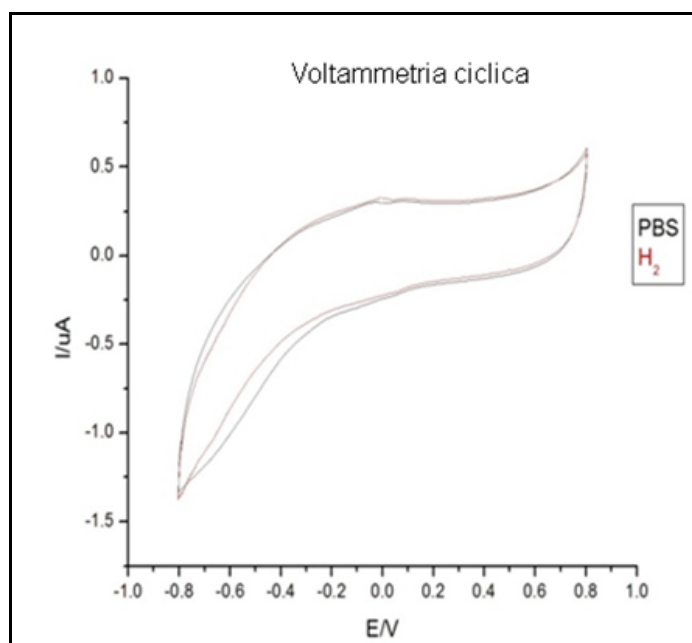


Fig. 19 CV in PBS/N₂ e inPBS/H₂ del micro sensore in epoxy/CNT

In evidenza, nella fig. 18, il picco di desorbimento dell'Idrogeno, invisibile nel voltammogramma ottenuto sul solo supporto carbonioso. L'Idrogeno viene ossidato già a potenziali inferiori a 0 Volt (Zhan et al., 2009).

La corrente generata a seguito dell'ossidazione delle molecole di idrogeno a ioni H⁺ sulla superficie dell'elettrodo di lavoro può essere così misurata e questa risulta essere proporzionale alla pressione parziale di idrogeno, quindi alla sua concentrazione. La letteratura riporta vari sensori per la misura dell'H₂ sviluppati depositando metalli su superfici carboniose (Suehiro, 2007; Wong et al., 2003; Sayagoa, 2004), ma non sono mai stati applicati al campo biologico.

4.4 Sensibilità del microsensore per l'idrogeno

La calibrazione del microsensore per l'H₂, è stata eseguita secondo le modalità descritte nel paragrafo 3.9.

Il microsensore a base carboniosa arricchito con carbonanotubi e platinizzato, ha mostrato una sensibilità 3,5 volte superiore (*slope* 1,452 nA/μM) rispetto a quello ottenuto con il classico elettrodo di platino (*slope* 0,43 nA/μM) come mostrato in figura 20A e 20B.

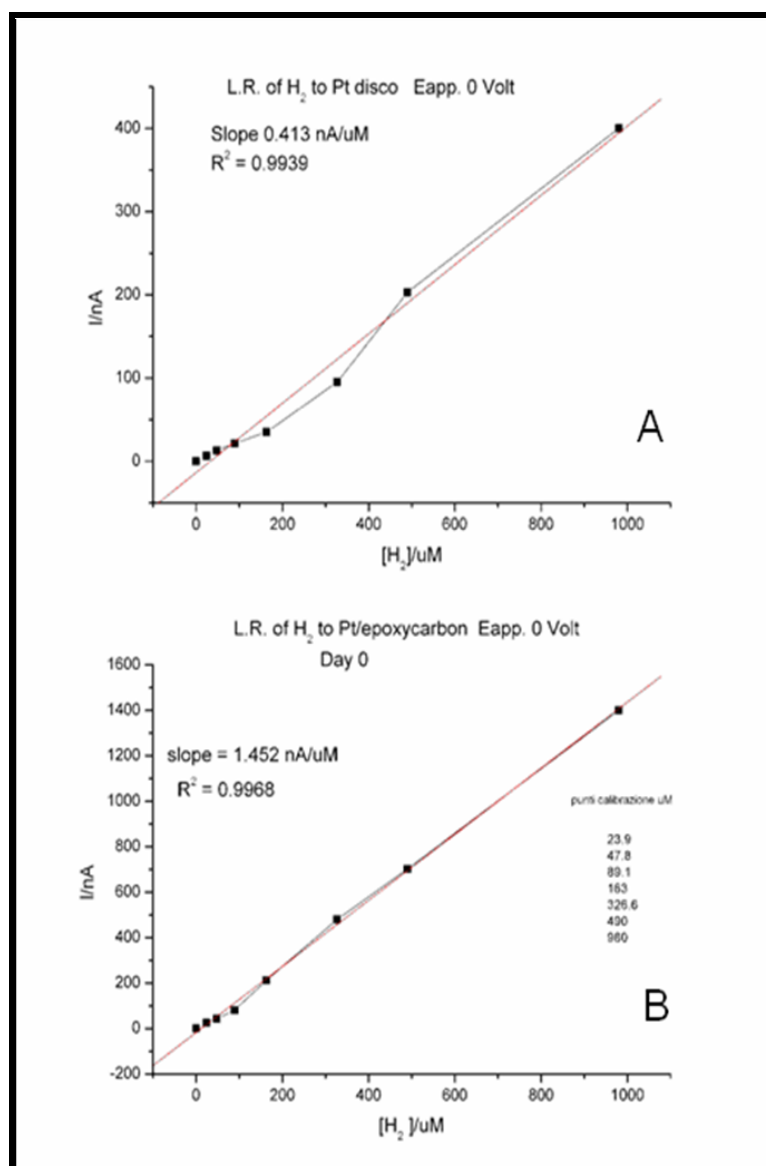


Fig. 20 Calibrazione di H₂ eseguita con il sensore al Pt (A) e calibrazione eseguita con il micro sensore in epoxy/CNT/Pt (B).

4.5 Stabilità nel tempo del micro sensore per l'idrogeno

Le calibrazioni sono state ripetute per diversi giorni consecutivi al fine di valutare la stabilità nel tempo del micro sensore platinizzato. Come mostrato in figura 21 il micro sensore per l'idrogeno mantiene pressoché inalterate le proprie caratteristiche di linearità e sensibilità per una settimana dalla sua costruzione.

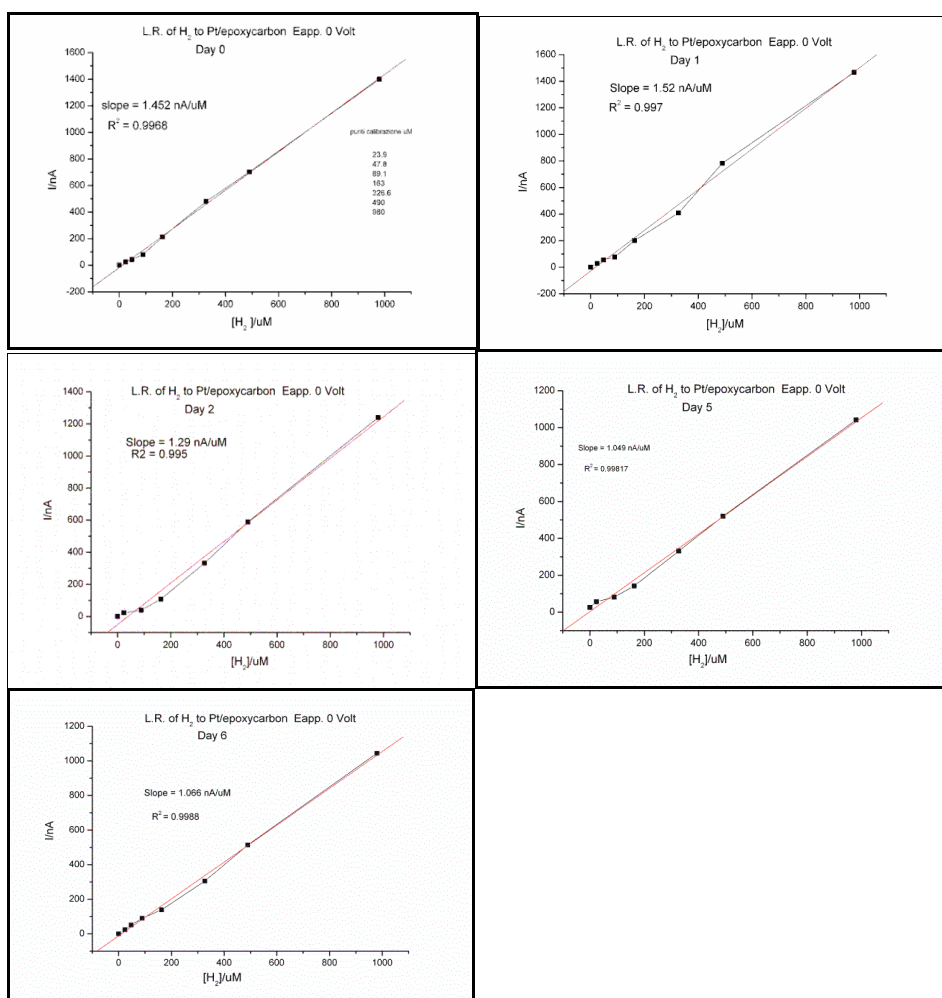


Fig.21 La figura mostra i risultati delle calibrazioni del micro sensore per l' H_2 , ripetute per 6 giorni.

4.6 Potenziali interferenze sul sensore per l'idrogeno

Ossigeno

Il sensore costruito per monitorare le variazioni di idrogeno è in grado di leggere anche le variazioni di ossigeno quando l'elettrodo di lavoro viene polarizzato a potenziali inferiori a -100mV, come mostrato nella figura 22

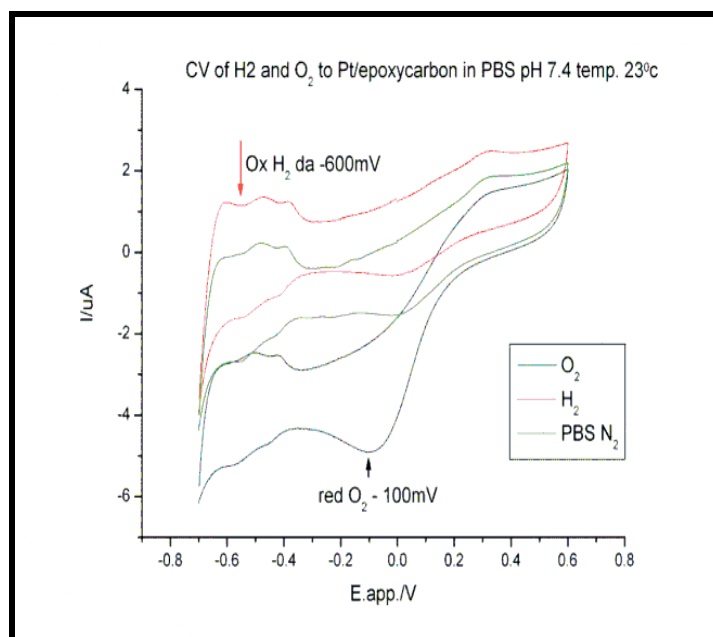


Fig. 22 CV in PBS N₂, O₂ e H₂ del microsensore in epoxy/CNT/Pt

L'utilizzo di potenziali positivi evita interferenze da parte di questo analita: per gli esperimenti condotti sulle colture cellulari è stato applicato un potenziale di +250mV.

Acido Ascorbico

L'acido ascorbico, a causa del basso potenziale di ossidazione e della sua abbondante presenza nei tessuti biologici, è una delle principali molecole interferenti nelle misurazioni elettrochimiche a potenziali ossidativi. La sua concentrazione cerebrale è circa 200 volte superiore rispetto a quella del sangue e varia a seguito di stimolazioni fisiologiche e farmacologiche (0,5 - 1 mM) (Calia et. al 2009, Miele and Fillenz 1996).

Nella CV mostrata in figura 23 è possibile osservare un aumento della corrente di ossidazione a seguito di un'iniezione di acido ascorbico 2mM rispetto alla corrente di *background* in PBS.

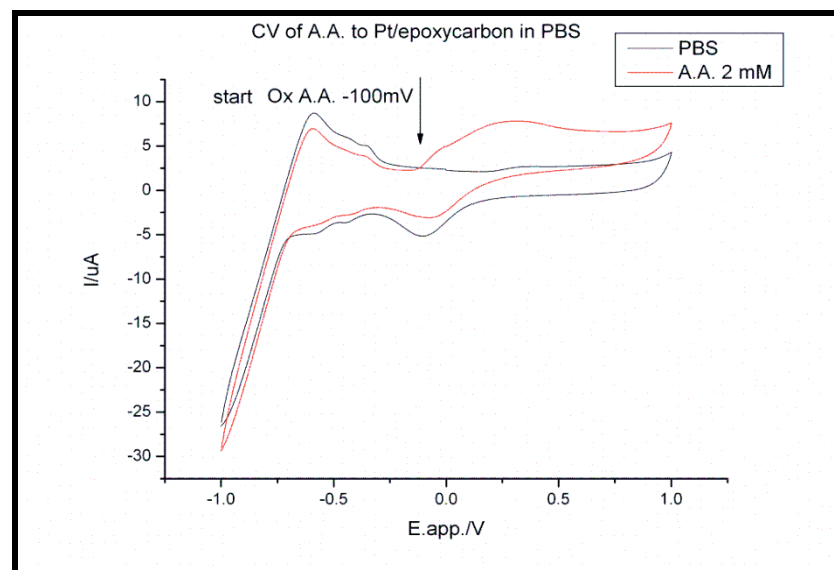


Fig.23 CV dell'acido ascorbico 2mM in PBS su micro sensore per l'H₂

Il potenziale di -100 mV, al quale ha inizio l'ossidazione dell'acido ascorbico è in accordo con i risultati riportati in letteratura (Ormonde and O'Neill, 1990 ; O'Neill, 1995).

La riduzione delle correnti derivate da interferenti anionici a pH fisiologico, come l'acido ascorbico nel caso di applicazioni in vivo, può essere ottenuta attraverso la deposizione un sottile strato di una membrana a scambio

protonico (Nafion®) sulla superficie esterna del sensore. Sul sensore viene applicata la membrana mediante 2 *quick deep* ad intervalli di 5 minuti l'uno dall'altro e successivamente il sensore viene fatto asciugare per 30 min a 40°C. Il Nafion® è un polimero ionico costituito da tetrafluoroetilenesolfonato, che espone sulla parte esterna della membrana, gruppi solfonici deprotonati, carichi negativamente che respingono molecole anioniche, e trova applicazione nella costruzione delle celle a combustibile come membrana a scambio protonico (Tang et al., 2013) e nella sensoristica (Migheli et al., 2008). Come mostrato in fig.24, il microsensore modificato con Nafion® risulta schermato dalla interferenza dell'AA mantenendo pressochè inalterata la sensibilità nei confronti dell' H₂, in accordo con quanto riportato in letteratura (Lim 2005).

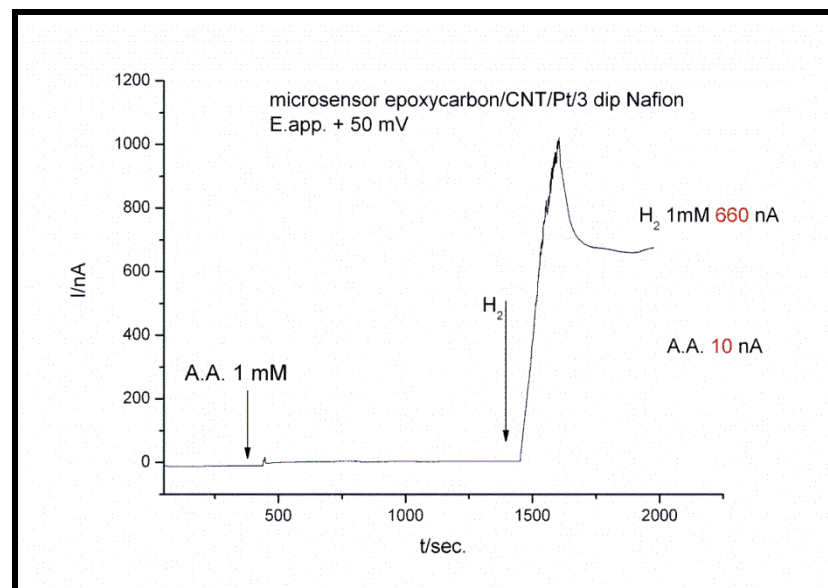


Fig.24 Effetti della deposizione di Nafion® nei confronti dell'interferenza generata dall'acido ascorbico.

4.7 Effetto dell'elettrolisi sulla vitalità cellulare

Gli esperimenti di controllo hanno incluso la produzione gas H₂ e O₂ mediante elettrolisi. L'evoluzione dei gas (che avviene in un ambiente separato dal compartimento cellulare), non ha mostrato alcun effetto sulla vitalità delle

cellule. Non sono stati rilevati inoltre, cambiamenti nei valori di pH (della sospensione cellulare), dovuti alla reazione elettrolitica.

4.8 Impiantabilità del micro sensore per l'idrogeno

Il metodo analitico sviluppato in questa tesi, caratterizzato da esperimenti su cellule, *in vitro*, è stato ulteriormente rivisitato allo scopo di renderlo idoneo all'applicazione in studi *in vivo*, su modelli animali. La tecnica della clearance dell'H₂, fondamentale per il monitoraggio del flusso ematico, si serve dell'ossidazione elettrochimica del gas. A differenza delle cellule PC12, l'organismo animale, è ricco di altre sostanze ossidabili a potenziali vicini a quello di ossidazione dell'idrogeno; l'acido ascorbico, è il primo interferente che deve essere considerato, seguono l'acido urico e altre molecole ossidabili. Il disegno del micro sensore utilizzato per gli esperimenti sulle cellule PC12, è stato modificato per l'aggiunta di Nafion[®] sulla superficie esterna. Il polimero di Nafion[®] scherma il sensore dagli interferenti ossidabili come acido ascorbico e acido urico (fig. 25).

4.9 Esperimenti di clearance: gas forniti da bombole e prodotti per elettrolisi

La tecnica della *clearance* dei due gas, attraverso esperimenti che mettono in relazione il tempo di eliminazione del gas con la velocità del flusso applicato, ha consentito il monitoraggio di ossigeno e idrogeno nel liquido di perfusione. La simulazione del flusso ematico, con le relative variazioni della velocità, è stata effettuata con due modalità differenti:

- 1-Variazione della velocità di *stirring*
- 2-Variazione delle velocità di flusso di perfusione

1-Gli esperimenti sono stati condotti saturando la cella elettrochimica col gas (idrogeno o ossigeno provenienti da bombole di stoccaggio) mantenendo la soluzione sotto agitazione magnetica costante mediante un'ancoretta rivestita di *teflon* delle dimensioni di 1 cm in un *beaker* contenente 20 ml di soluzione (diametro 3 cm). Una volta raggiunta una corrente stabile, derivata

dall'ossidazione nel caso dell'idrogeno e dalla riduzione, nel caso dell'ossigeno, viene sospesa la somministrazione del gas e si registra la *clearance* del gas misurando il tempo necessario per ottenere una concentrazione in cella pari a metà di quella iniziale (*Half Life, HL*, fig.25).

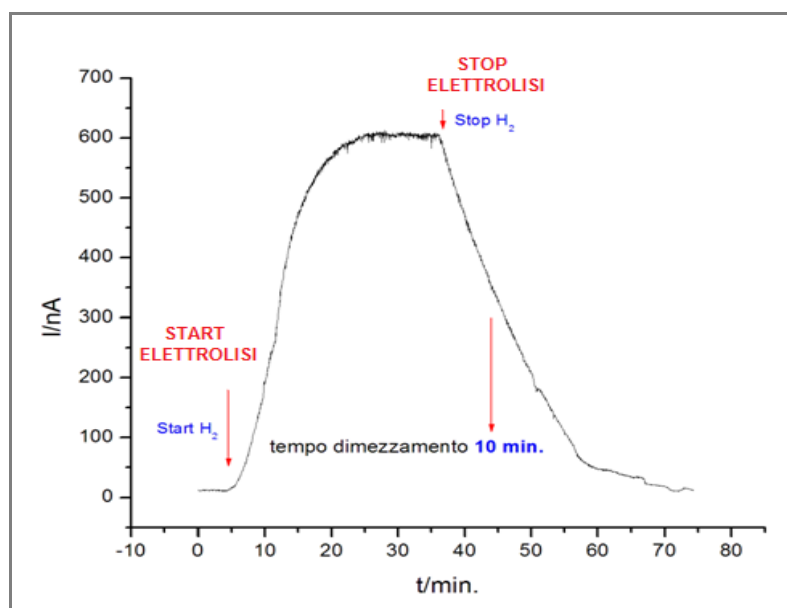


Fig.25 tracciato dell'esperimento di misurazione della clearance dell'H₂

L'esperimento viene ripetuto con tre differenti velocità di *stirring* e vengono plottati i dati per la misurazione della curva di decadimento esponenziale (*exponential decay*) del gas che indicano le cinetiche di eliminazione dell'H₂ e dell'O₂ dalla soluzione. Le velocità di *stirring* sono state calcolate misurando i numeri di giri dell'ancoretta per minuto ottenendo 3 velocità crescenti rispettivamente di 150/300/600 giri per minuto. Per quanto riguarda l' H₂, le *HL* erano comprese tra 75±5 minuti e 10±1 minuti (fig. 27 A). Simili risultati sono stati ottenuti anche per quanto riguarda la clearance dell'ossigeno nelle medesime condizioni.

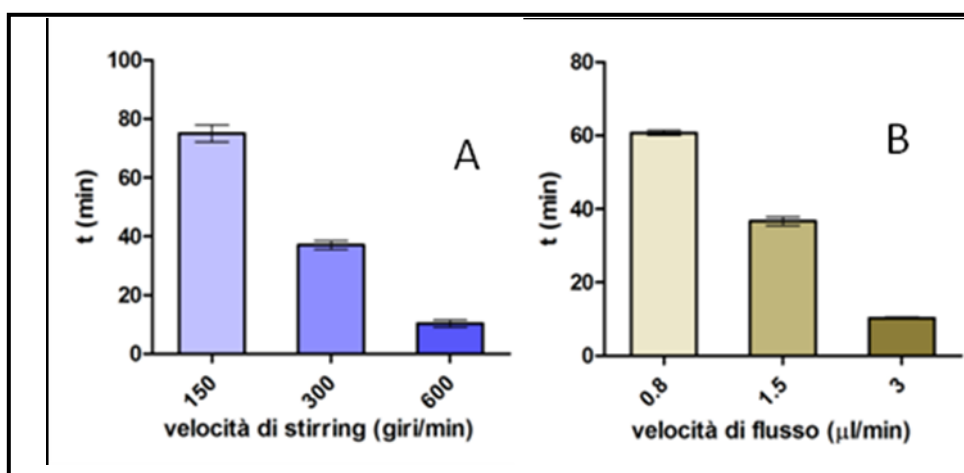


Fig.27 grafici della clearance misurata variando la velocità di stirring (A) e la velocità di flusso (B).

2-Per gli esperimenti di *clearance* ottenuti variando il flusso di perfusione, i gas sono stati ottenuti mediante produzione *in situ* per elettrolisi partendo da una soluzione salina tamponata a pH 7.4.

Una pompa da microinfusione a velocità regolabile e costante, ha permesso di misurare il tempo di clearance dei gas a flussi diversi, mantenendo fissi tutti gli altri parametri dell'esperimento (Fig. 26B).

Il liquido di perfusione è stato immesso nella cella elettrochimica mediante una sonda da microdialisi che consente lo scambio dei gas prodotti mediante elettrolisi. L'innesco della reazione elettrolitica comporta un aumento delle concentrazioni dei gas in cella, riscontrabile dall'incremento delle correnti di ossidoriduzione.

Una volta raggiunta la stabilizzazione della corrente, viene interrotta l'elettrolisi e si misura il tempo di *clearance* dei gas dalla soluzione e la determinazione delle *HL*, analogamente agli esperimenti già descritti. La cinetica di decadimento anche in questo caso si è rivelata di tipo esponenziale e i risultati ottenuti sono del tutto analoghi a quelli ottenuti mediante *stirring*. L' H_2 ha mostrato *HL* comprese tra 60 ± 3 minuti e 9 ± 1 minuti come mostrato in figura 27 B. Simili risultati sono stati ottenuti anche per quanto riguarda la clearance dell'ossigeno nelle medesime condizioni.

In entrambe le condizioni sperimentali adottate, lo stadio cineticamente determinante (quello più lento), è la diffusione. Da ciò deriva che velocità di *stirring* maggiori, o velocità di flusso di perfusione maggiori, comportano valori inferiori di *HL* indicativi di un più efficiente clearance del gas dalla soluzione.

Il tempo necessario alla completa eliminazione dell'idrogeno, dipende esclusivamente dalla velocità del flusso di perfusione applicata.

4.10 Test sulle cellule

Una volta caratterizzati i sensori ed effettuati gli esperimenti di clearance, si è passati all'applicazione del dispositivo in studi *in vitro* condotti su una linea cellulare dopaminergica (PC12).

Il consumo di O₂, da parte delle cellule, è stato misurato (per via elettrochimica), in un sistema chiuso, mantenendo un flusso di perfusione costante. È importante sottolineare che *in vivo*, l'O₂ extracellulare rilevabile deriva da un equilibrio dinamico tra consumo di O₂ da parte delle cellule e apporto di O₂ tramite il sangue.

Perciò soltanto in condizioni di flusso ematico costante è possibile attribuire una variazione dei livelli di O₂ ad una variazione del consumo dello stesso. Da qui, l'importanza di poter monitorare le variazioni del flusso (mediante la tecnica della clearance di H₂) in modo da discriminare tra una variazione del consumo di O₂ e una variazione della velocità del flusso ematico. In condizioni fisiologiche, un aumento dell'apporto di O₂ tramite il sangue, quindi un incremento del flusso ematico corrisponde ad un incremento dell'attività cellulare, emodinamica (Pittman 2011). Una compromissione del flusso ematico o un'alterazione del metabolismo cellulare, comporta squilibri emodinamici che si riflettono in condizioni patologiche anche molto gravi, specie in aree delicate come quelle cerebrali, dove le cellule nervose dipendono strettamente da un corretto apporto energetico tramite il sangue. Durante gli esperimenti *in vitro*, è stato misurato il consumo di O₂ in relazione al numero di cellule caricate nella cella elettrochimica del dispositivo descritto nella sezione 3.15. Nel dispositivo sono state caricate le cellule PC12 preparate a diverse concentrazioni (0.5, 1.0 e

1.5·10⁶ cellule/50µl PBS/glucosio) ed è stato monitorato il consumo di O₂ per un ora. Le cellule, mantenute in condizioni di flusso costante (3µl/min), hanno consumato rispettivamente il 47%, 72% e 94% dell'O₂ inizialmente presente nella cella elettrochimica (fig.28 e 29). I risultati ottenuti hanno mostrato una relazione lineare tra numero di cellule caricate e consumo di O₂ (*slope* 47.38 ±2.32; R²= 0.997; fig.29) in accordo coi risultati ottenuti da (Giordano et al., 2012)

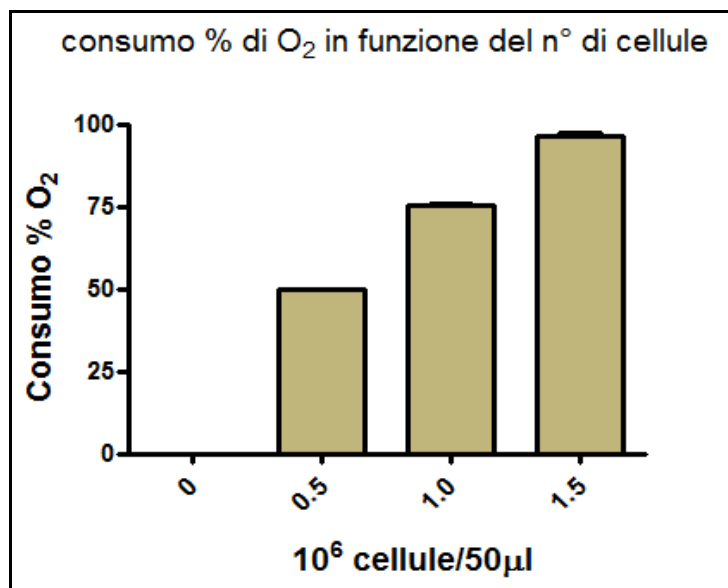


Fig. 28 grafico del consumo di O₂ in funzione del n°di cellule

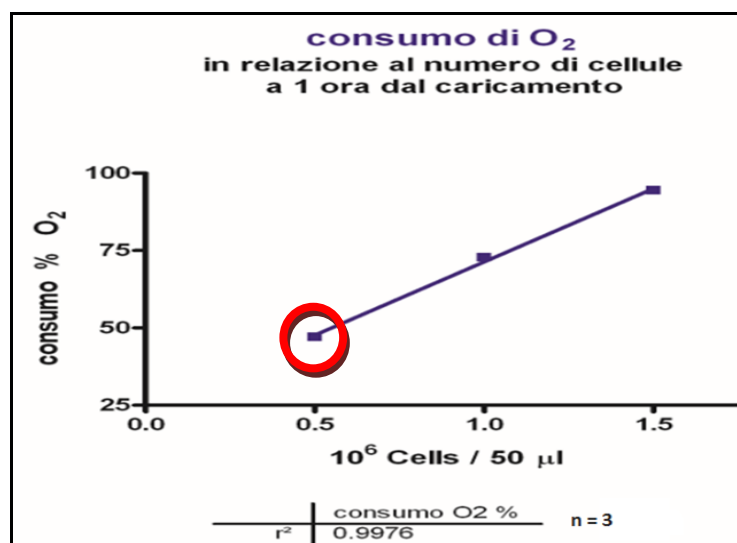


Fig. 29 realazione tra n°di cellule e consumo di O₂

Il tracciato in figura 30 mostra l'andamento elettrochimico del micro sensore e il consumo dell'O₂ negli esperimenti a flusso costante a seguito del caricamento delle cellule PC12 (0.5·10⁶ cellule/50µl PBS/glucosio)

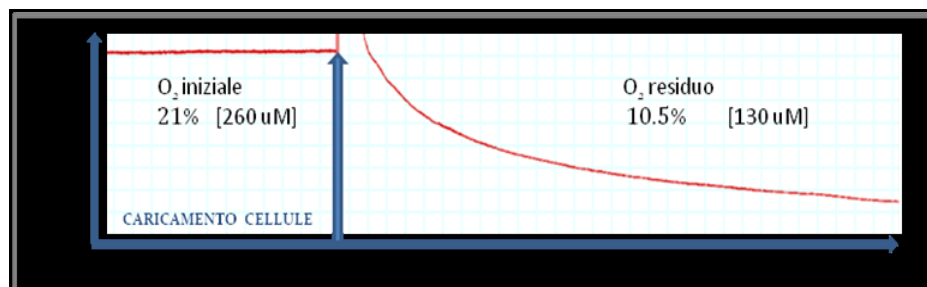


Fig.30 tracciato della corrente di riduzione dell'O₂ influenzato dal caricamento delle PC12

Il micro sensore, in assenza delle cellule, registra una corrente stabile risultante dalla riduzione dell'O₂ presente nella soluzione in condizioni standard di pressione e temperatura. Il valore di corrente registrato è di 130 nA.

In seguito al caricamento delle cellule PC12, la concentrazione di O₂ disponibile diminuisce a causa del consumo da parte delle cellule che lo utilizzano per scopi metabolici. Il valore della corrente di riduzione dell'O₂, dopo un ora dal caricamento delle cellule è di 62 nA, ovvero, ridotta di circa il 50%. Conoscendo lo *slope* del micro sensore (ottenuto dalle calibrazioni descritte nel paragrafo 4.2), è possibile stabilire la concentrazione di O₂ consumata dalle cellule e risalire al consumo di O₂ singolo pro cellula in quanto è noto il numero di cellule caricato nella cella elettrochimica.

Gli esperimenti effettuati utilizzando un numero di cellule pari a 0.5·10⁶ cellule/50µl PBS/glucosio hanno mostrato il miglior rapporto in termini di consumo e disponibilità di O₂ nelle condizioni sperimentali utilizzate.

4.11 Le cellule fissate con etanolo non consumano O₂

Al fine di attribuire le variazioni di corrente osservate soltanto al consumo di ossigeno da parte delle cellule in soluzione e non a reazioni di ossidazione su componenti della membrana cellulare, sono stati approntati degli esperimenti caricando all'interno del dispositivo un numero di cellule pari a 0.5·10⁶ cellule /50µl PBS preventivamente fissate con etanolo.

Non è stata riscontrata alcuna variazione nella corrente dell'O₂ a seguito del loro caricamento (fig.31).

Questo dimostra che il dispositivo sviluppato, non misura le variazioni della concentrazione di O₂ derivate da reazioni di ossidoriduzione diverse da quelle eseguite nei processi fisiologici del metabolismo ossidativo cellulare.

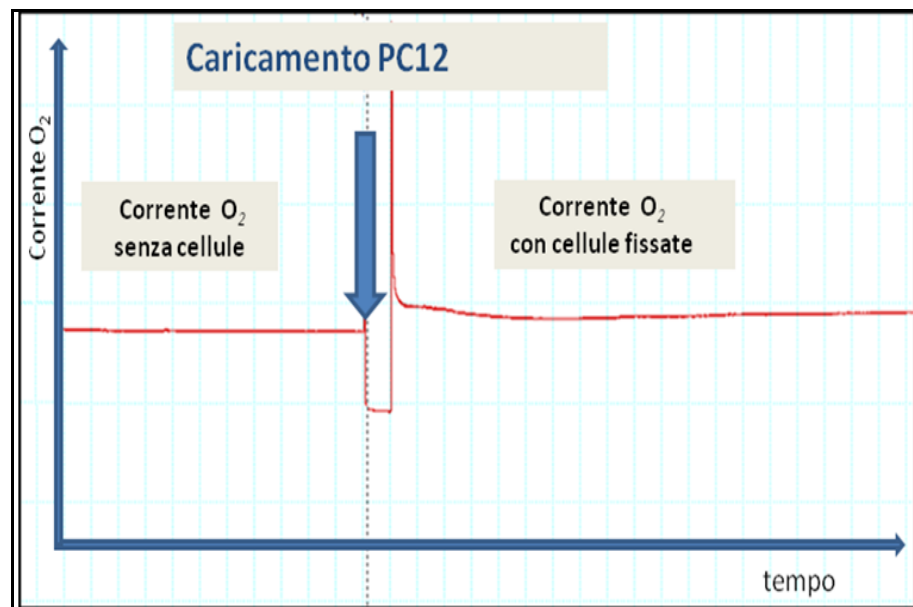


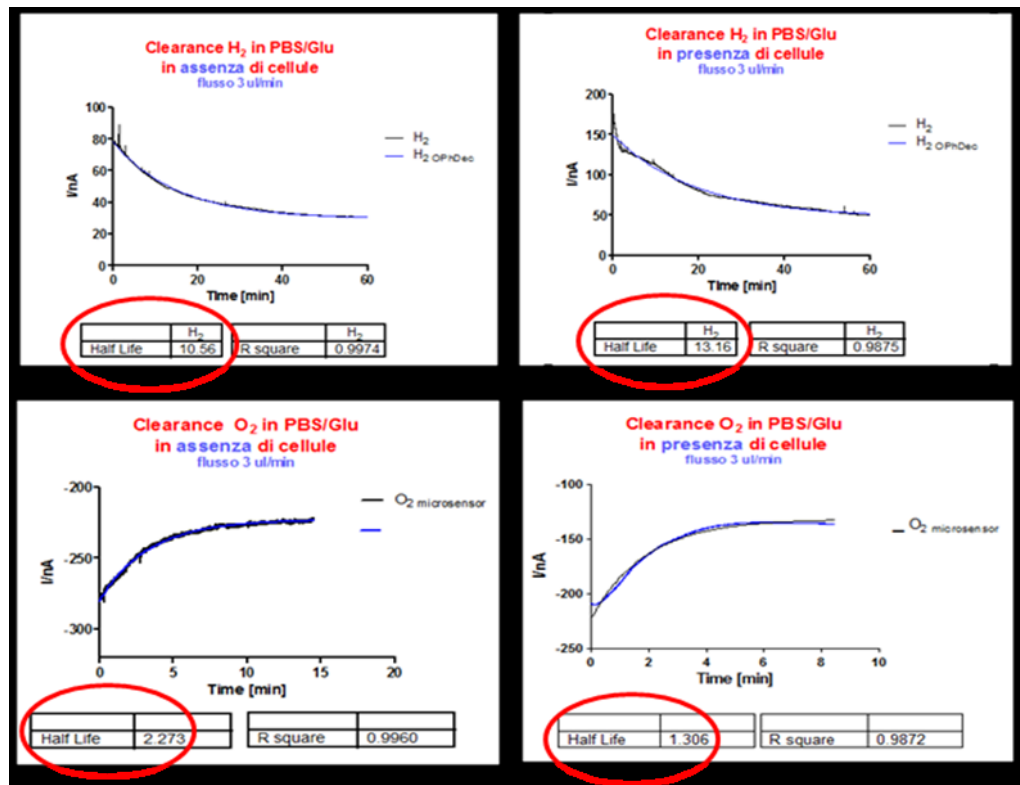
Fig.31 La corrente di riduzione dell'O₂ non viene alterata dal caricamento delle cellule fissate

4.12 Effetto delle PC12 sulla clearance di idrogeno e ossigeno

Si è voluto studiare inoltre, l'effetto delle cellule sulla cinetica di eliminazione dei gas prodotti per elettrolisi; per far ciò, si sono paragonati i tempi di clearance di H₂ e O₂ in assenza e in presenza delle cellule. Al raggiungimento di una corrente di base stabile dopo il caricamento delle cellule nella camera elettrochimica, si è proceduto alla produzione dei gas mediante di elettrolisi *in situ* per un tempo mantenuto costante durante tutti gli esperimenti (5 minuti) ed è stato registrato un aumento del segnale in tutti i sensori. Una volta interrotta la reazione, i segnali relativi ai sensori per l'H₂ e l'O₂ sono diminuiti con una cinetica di tipo esponenziale. I grafici relativi alle curve di *exponential decay* e comparati i valori di *Half Life* sono riportati in figura 32. I risultati hanno mostrato un comportamento differente nei due sensori.

Il tempo di clearance dell'H₂ non ha subito variazioni significative in assenza e in presenza delle cellule (passando da *HL* = 10,56 minuti a *HL* = 13,16 minuti), perciò si può considerare la clearance dell' H₂ indipendente dalla presenza delle cellule nella cella elettrochimica e legato solo al flusso di perfusione, che è rimasto costante alla velocità di 3 µl/min per tutti gli esperimenti. Tuttavia, alla luce delle recenti scoperte sul ruolo antiossidante dell'H₂ (Otha 2012) non si può escludere un utilizzo della cellula di quantità limitate di idrogeno molecolare a fini antiossidanti, non apprezzabile nelle condizioni e con le metodiche sperimentali utilizzate.

Al contrario, la clearance dell'O₂ è aumentata in modo significativo in presenza delle cellule, dimostrando che il metabolismo ossidativo cellulare si somma al contributo del flusso di perfusione, nell'eliminazione dell'O₂ prodotto per elettrolisi. Difatti, il valore della *Half Life* si riduce da 2,27 minuti in assenza di cellule a 1,30 minuti in presenza di cellule con una riduzione del 43% del tempo di clearance.



Half Life	H ₂	O ₂
Senza Cellule	10,560	2,273
Con Cellule	13,160	1,306
Variazione % Vs controllo	+23%	-43%

Fig.32 grafici e tabella della clearance di H₂ e O₂ valutata in base ai parametri di half-life.

4.13 Effetto dell'MPP⁺ sulle cellule PC12

Il dispositivo validato dai risultati ottenuti dagli esperimenti condotti sulle cellule PC12, è stato utilizzato nello studio degli effetti farmacologici sul metabolismo ossidativo cellulare.

Poiché le cellule PC12 utilizzate sono di tipo dopaminergico, la scelta della sostanza da somministrare è ricaduta su una tossina a *target* mitocondriale, e nello specifico, la neurotossina 1-metil-4-phenilpiridina (MPP⁺).

L'MPP⁺, forma attiva della protossina MPTP, è capace di interferire con la respirazione mitocondriale, attraverso il blocco del complesso I della catena di trasporto elettronico mitocondriale della respirazione cellulare.

Nel presente studio si è voluto valutare il danno da MPP⁺ indotto sulle cellule PC12 (in relazione al consumo di ossigeno) a seguito di un trattamento effettuato somministrando per via microdialitica una soluzione della tossina nella cameretta contenente le cellule.

4.14 Elettroattività dell' MPP⁺

Prima di somministrare l'MPP⁺ alle cellule, è stata valutata la possibile interferenza della molecola con le correnti basali dei micro sensori.

Mediante esperimenti di voltammetria ciclica (CV) e amperometria a potenziale costante (CPA), sono state escluse le interferenze aspecifiche della molecola alle condizioni sperimentali adottate.

Sono state iniettate soluzioni della neurotossina alle concentrazioni di 0.2, 0.5 e 1 mM e confrontate le correnti con quelle di *baseline* registrate in PBS. Nella CV riportata in figura 33, è possibile notare come la molecola non risulti elettroattiva e quindi non dia interferenza sul microsensore utilizzato per la determinazione delle concentrazioni di O₂ mentre sul sensore per l'H₂ sono riscontrabili un picco di ossidazione (580 mV) e un picco di riduzione (400 mV) dell' MPP⁺ come già riportato anche in letteratura da Nakazato e Akiyama (Nakazato and Akiyama, 1998).

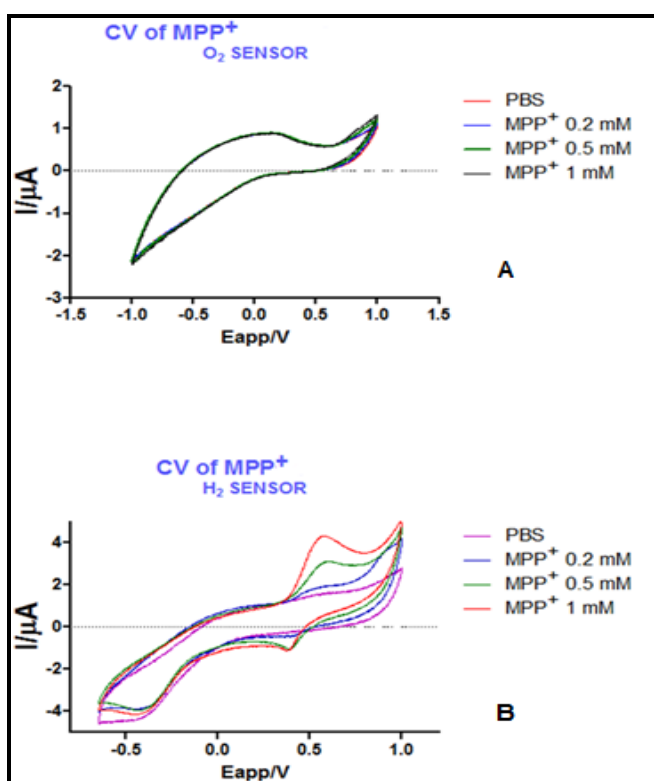


Fig.33 CV dell'MPP⁺ sui sensori per l'O₂ (A) e per l'H₂(B).

Gli esperimenti in CPA sono stati eseguiti applicando un potenziale di +250mV al microsensore per l'H₂ (potenziale più basso di quello di riduzione della tossina) e un potenziale di -700mV al microsensore per l'O₂. Iniezioni successive di concentrazioni crescenti di MPP⁺ non hanno mostrato nessuna interferenza dell'MPP⁺ sulla corrente di base di entrambi i micro sensori, come mostrato in figura 34.

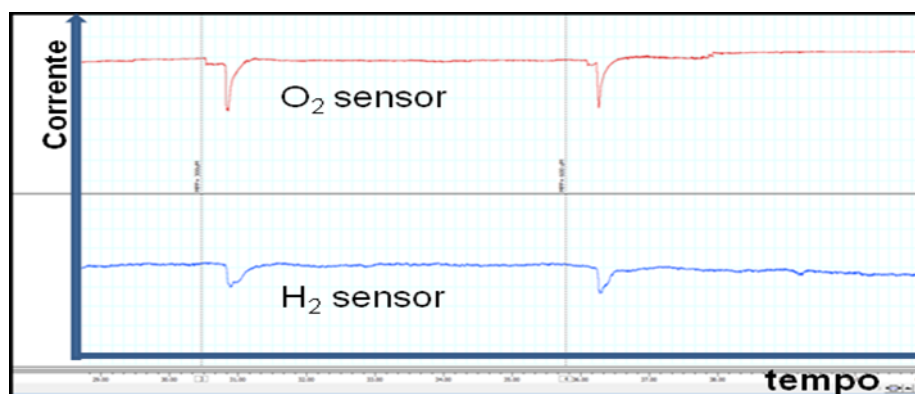


Fig.34 Dosi crescenti di MPP⁺ non alterano la corrente di base dei sensori per l'O₂ e l'H₂.

4.15 Consumo di O₂ nelle cellule trattate con MPP⁺

L'esperimento è stato condotto all'interno del dispositivo precedentemente descritto, (sez. 3.15), applicando la tecnica della clearance e monitorando il consumo di O₂ delle cellule PC12 prima e dopo il trattamento farmacologico con MPP⁺.

Dopo registrazione di una corrente di base stabile di O₂, si è proceduto al caricamento delle cellule PC12 (0.5·10⁶ cellule/50µl PBS/glucosio) in un volume finale di 250 microlitri.

E' stato monitorato per 1h il consumo di O₂ delle PC12 in condizioni fisiologiche ed è stato riscontrato un consumo pari al 50% del contenuto iniziale di ossigeno, in accordo coi risultati illustrati nella sezione 4.10. La soluzione contenente le cellule, è stata perfusa, ad una velocità costante di 3 µl/min con una soluzione di PBS/glucosio mediante la sonda da dialisi integrata nella cella elettrochimica.

Dopo un ora, è stata sostituita la perfusione di PBS/glucosio con la perfusione di una soluzione di 1,5 mM MPP⁺/PBS/glucosio. Il consumo di O₂, da parte delle cellule trattate con la neurotossina, ha subito una diminuzione che tuttavia non è risultata essere statisticamente significativa. Dopo 60 minuti di trattamento con la neurotossina, i gas H₂ e O₂ sono stati prodotti *in situ* mediante elettrolisi di 5 minuti, ripristinata la perfusione con PBS/glucosio e sono stati monitorati i tempi di clearance dei due gas in queste condizioni (fig.35).

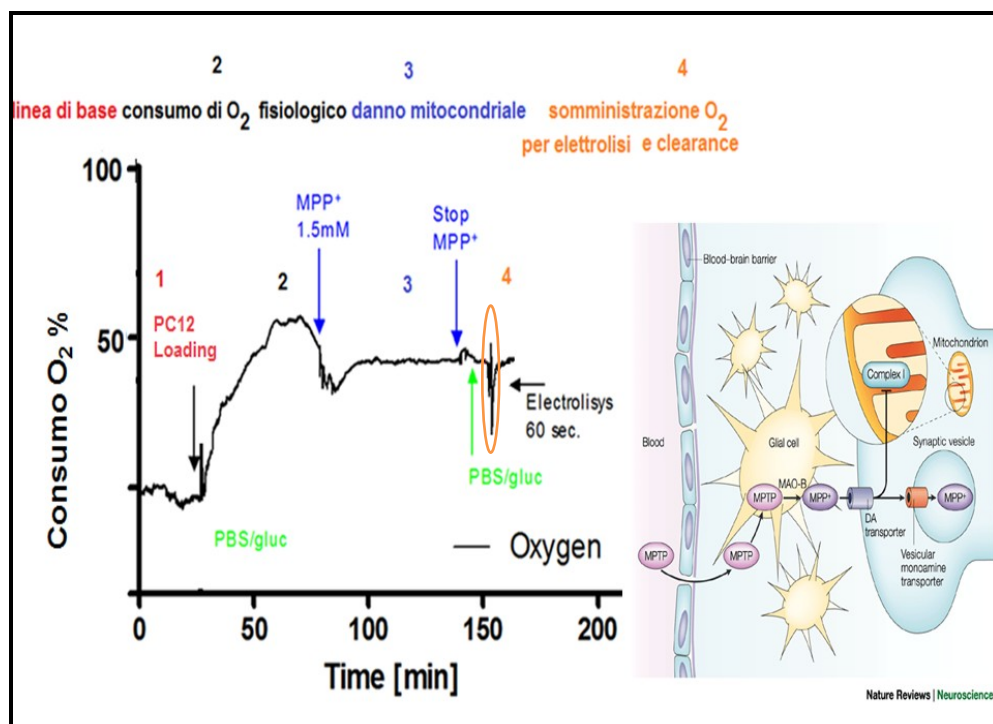


Fig.35 tracciato della corrente del micro sensore per l'O₂ a seguito del caricamento delle cellule, del trattamento con MPP⁺ e dell'elettrolisi.

4.16 Effetto delle PC12, dell'MPP⁺ e delle cellule fissate sulle correnti dei sensori

Il grafico in figura 36 mostra gli effetti della presenza delle cellule PC12 e del trattamento con la neurotossina MPP⁺, sulle correnti dei micro sensori per l'H₂ e per l'O₂. Un ulteriore test ha valutato l'influenza delle cellule fissate, sulla corrente basale dei medesimi sensori. La corrente, è stata espressa come % della linea di base dei sensori e le variazioni della corrente (riconducibili alla presenza delle cellule e al trattamento farmacologico), sono riferite ai valori di corrente della linea di base di ciascun elettrodo.

PRESENZA DELLE CELLULE:

La corrente di base del microsensore per l'H₂, non viene modificata dalla presenza delle cellule, mentre il valore della corrente di O₂, mostra un decremento del 50%, dovuto all'utilizzo da parte delle cellule di una quota di ossigeno durante i meccanismi di respirazione e metabolismo cellulare fisiologico.

TRATTAMENTO CON MPP⁺:

La neurotossina MPP⁺, non ha modificato la corrente di H₂, ma ha ridotto, benchè non in modo significativo, la corrente di O₂.

CELLULE FISSATE:

Le cellule PC12, fissate con etanolo, non hanno modificato le correnti basali dei sensori per l'H₂ e per l'O₂.

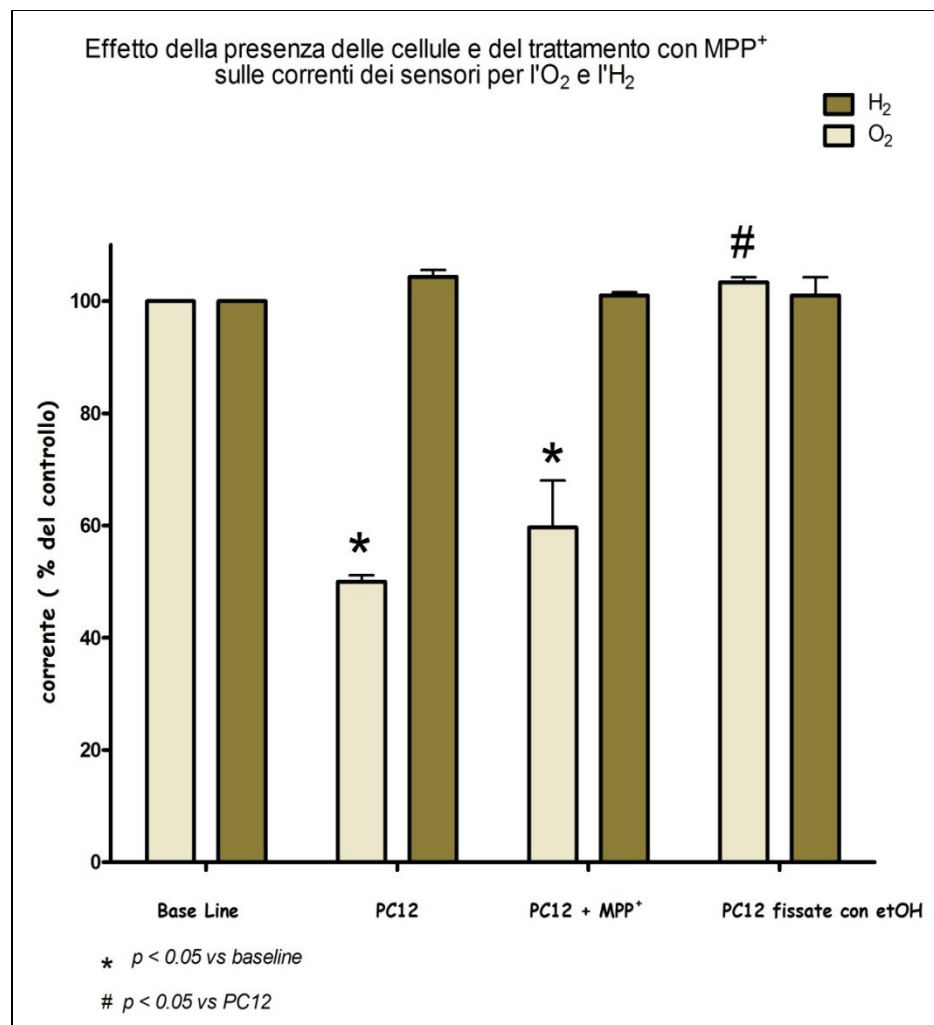


Fig.36 il grafico riporta la variazione delle correnti dei sensori per l'H₂ e per l'O₂ a seguito del caricamento delle cellule vive, trattate con MPP⁺ e fissate con etanolo.

4.17 Clearance dell' H_2 a seguito del trattamento delle PC12 con MPP^+

La reazione di elettrolisi ha prodotto all'interno del dispositivo, il gas H_2 fino a questo punto non presente nell'ambiente extracellulare. Di fatti, il microsensore per l'idrogeno, non ha modificato la linea di base negli step precedenti, non essendo influenzato dal caricamento delle cellule, ne dalle sostanze perfuse mediante la sonda microdialitica.

Immediatamente dopo l'attivazione della reazione elettrolitica invece, il sensore per l'idrogeno, ha registrato un aumento della corrente di ossidazione dell'idrogeno indicativa della presenza del gas nella cella elettrochimica, come mostrato in figura 37B.

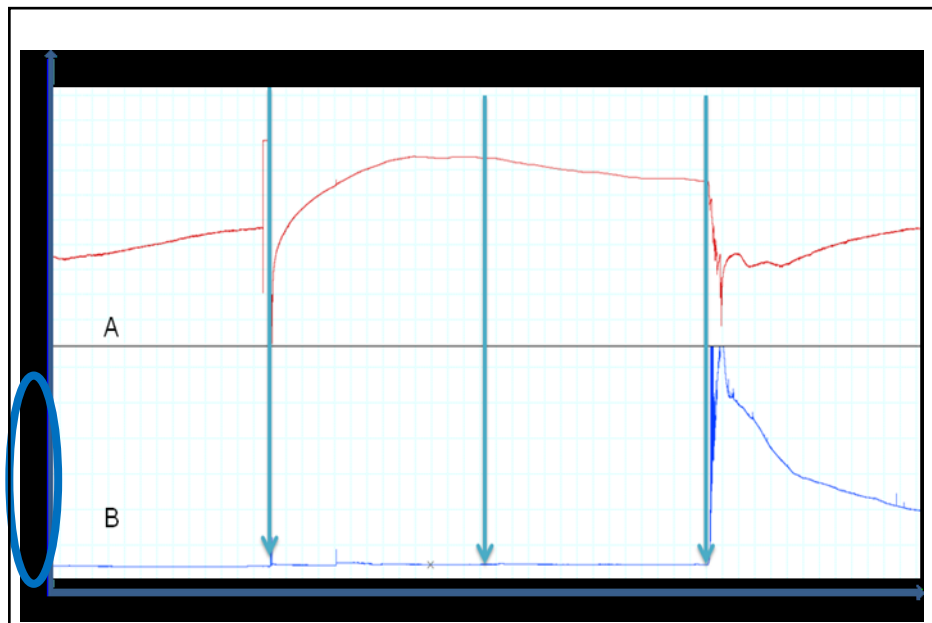


Fig.37 tracciato della corrente del sensore per l' O_2 (A) e per l' H_2 (B).

La clearance dell'idrogeno non ha mostrato differenze coi dati precedentemente illustrati in relazione ai parametri di *exponential decay* e di *Half Life* presi in considerazione (dati non mostrati).

4.18 Clearance dell'O₂ a seguito del trattamento delle PC12 con MPP⁺

La clearance dell'O₂, a seguito del trattamento farmacologico delle cellule (fig.n.38C), ha mostrato invece una netta diminuzione rispetto ai risultati ottenuti in condizioni fisiologiche ($HL = 1.30$; fig.38B). Il tempo necessario alle cellule, per consumare l'O₂ prodotto mediante elettrolisi, è aumentato a valori paragonabili a quelli ottenuti negli esperimenti in assenza delle cellule ($HL = 2.27$; fig.38A).

L'incremento del valore di *Half Life* nelle cellule trattate con MPP⁺ ($HL = 2.91$) è in accordo con l'ipotesi che le cellule PC12 trattate con la neurotossina abbiano subito una compromissione del metabolismo energetico mediante il blocco della catena respiratoria mitocondriale.

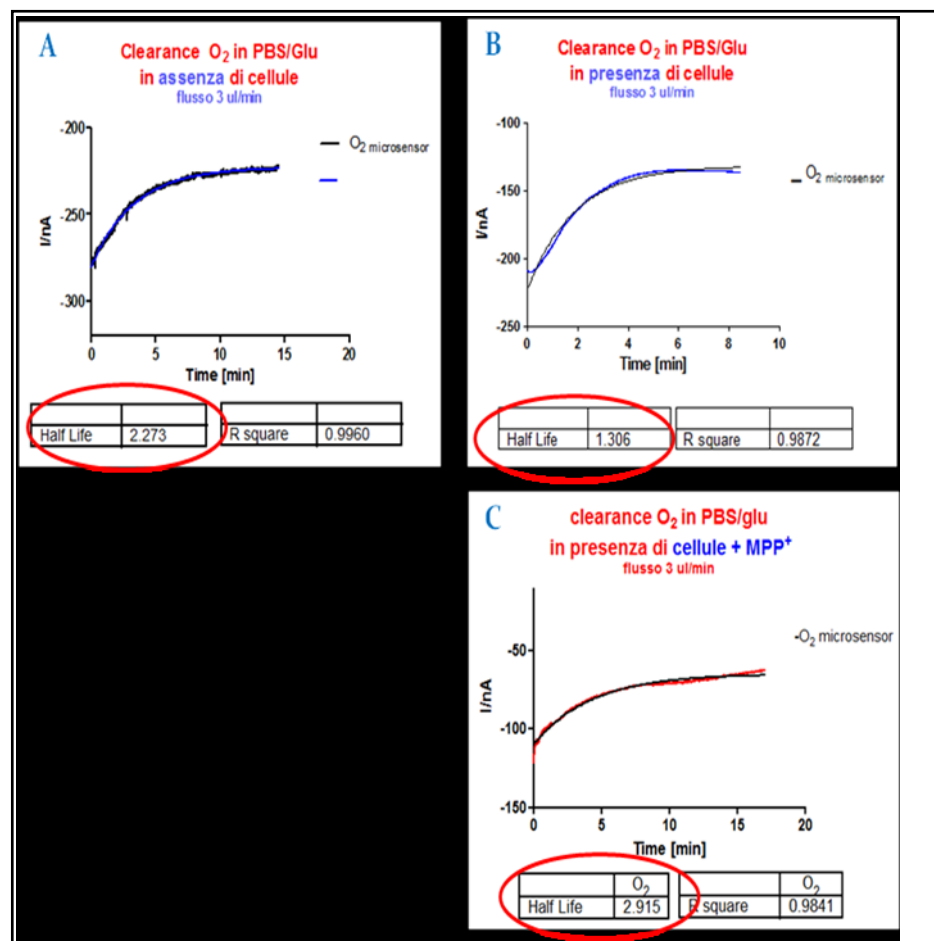


Fig.38 cinetiche del decadimento esponenziale relative alla clearance dell'O₂

A \Rightarrow **B** La clearance dell'O₂ viene incrementata dalla presenza delle cellule (la respirazione cellulare si somma al contributo del flusso di perfusione).

B \Rightarrow **C** La neurotossina MPP⁺ tramite il blocco della catena respiratoria mitocondriale riduce il contributo cellulare nella clearance dell'O₂ che risulta funzione del flusso di perfusione.

4.19 Saggi di vitalità

Il saggio di vitalità cellulare è stato effettuato come già descritto nella sezione materiali e metodi. Dopo la preparazione iniziale, la vitalità delle cellule è testata con il colorante Trypan Blue utilizzando la camera di Burker per la conta. Le cellule PC12 sono state aspirate delicatamente nel tubo microdialitico in piccoli clusters o in singole cellule. La durata degli esperimenti è di circa 3 ore.

I risultati relativi ai saggi di vitalità cellulare, indicano che né il fenomeno dell'elettrolisi, né il tempo impiegato per gli interi esperimenti, alterano la vitalità cellulare rispetto ai controlli ($96.8 \pm 2.1\%$). La vitalità finale è pari $95.2 \pm 3.2\%$ e la mortalità finale è pari al $5,42 \pm 1.53\%$. Soltanto il trattamento con la neurotossina MPP⁺, ha fatto riscontrare un aumento della mortalità delle PC12 pari al 20% di quella registrata sui controlli utilizzati come riferimento. Questo dato conferma i risultati ottenuti da (Giordano S. et al., 2012). Nella figura 39, i controlli si riferiscono alla sospensione cellulare prima del caricamento in cella (controllo 1) e dopo la durata dell'esperimento (controllo 2).

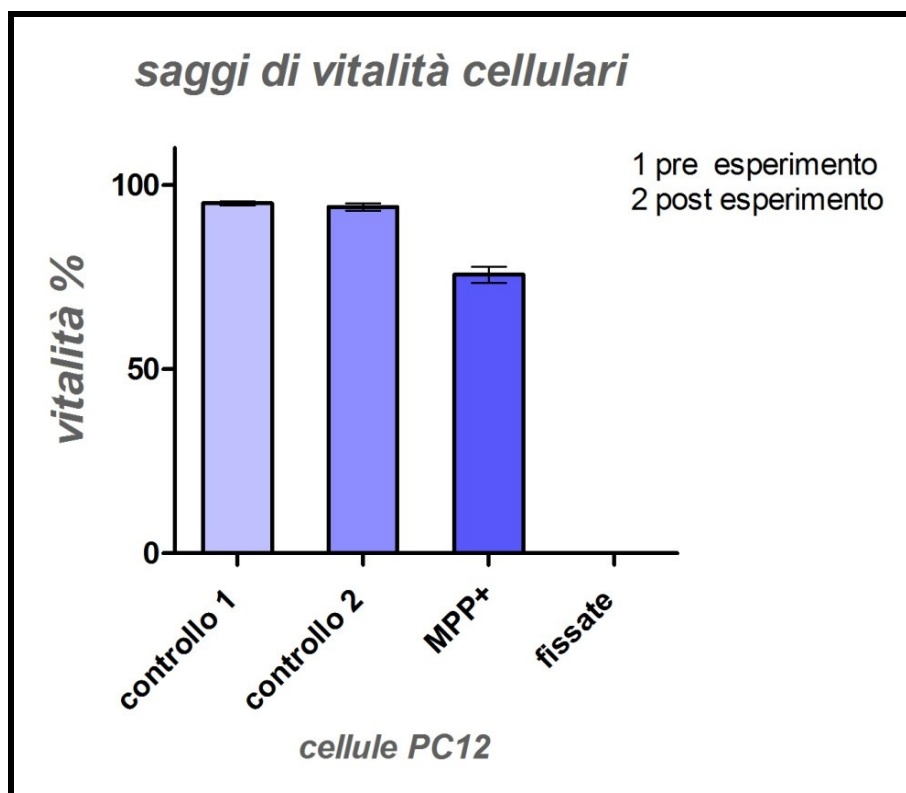


Fig.39 Grafico dei saggi di vitalità cellulari nelle condizioni di controllo, trattato, fissaggio con etanolo.

5 CONCLUSIONI

L'importanza della disponibilità di ossigeno molecolare, del suo trasporto, e quindi, del suo corretto utilizzo, è stata descritta nel corso delle sezioni precedenti.

Lo stato di salute di una cellula, di un neurone o di un'area cerebrale può essere valutato dal punto di vista energetico monitorandone il flusso ematico ed il consumo di ossigeno extracellulare.

Il dispositivo progettato, sviluppato e caratterizzato in questo lavoro, si è mostrato un valido modello di studio *in vitro* del metabolismo energetico cellulare. I risultati degli esperimenti, mostrano come sia stato possibile ottenere importanti informazioni biochimiche e fisiologiche, attraverso il monitoraggio continuo di parametri difficilmente apprezzabili e interpretabili con le tecniche comunemente impiegate attualmente. Il modello di studio presentato, ha permesso il monitoraggio in tempo reale del flusso di perfusione (simulando un flusso ematico) e del consumo di O₂ cellulare sia in condizioni fisiologiche che a seguito di un trattamento farmacologico. La possibilità di regolare la disponibilità di gas *in loco* nella camera analitica, ha consentito di valutare la funzionalità mitocondriale misurando la capacità delle cellule di consumare l'O₂ a seguito della produzione del gas mediante elettrolisi. Il trattamento farmacologico con la neurotossina MPP⁺, in accordo al suo meccanismo d'azione, ha alterato il consumo dell'O₂ molecolare da parte delle cellule. Questo dato può essere rilevato sia dalle differenti correnti di ossigeno extracellulare registrate nei gruppi sottoposti a trattamento farmacologico rispetto alle cellule mantenute in condizioni fisiologiche, sia dalle differenti velocità di clearance, a seguito di produzione dei gas per elettrolisi. L'elaborazione statistica dei dati ottenuti dagli esperimenti, evidenzia una tendenza delle cellule trattate con MPP⁺, a ridurre l'utilizzo (e quindi il consumo) di ossigeno, benché questa tendenza non sia risultata essere

statisticamente significativa. Questo risultato, apre le porte ad una duplice interpretazione:

- 1-L'MPP⁺, in accordo col suo meccanismo d'azione, blocca il trasferimento di elettroni nella catena respiratoria mitocondriale, disaccoppiando il trasporto elettronico dalla fosforilazione ossidativa e impedendo di fatto il consumo di O₂ destinato alla produzione di ATP. Tale evidenza può giustificare la diminuzione del consumo di O₂ registrato negli esperimenti.
- 2-L'MPP⁺, bloccando la funzione mitocondriale, promuove un consumo di O₂ non respiratorio, ovvero non destinato alla produzione di energia, ma allo sviluppo di specie reattive all'ossigeno (ROS), che innescano lo stress ossidativo della cellula. In questo caso, è giustificata una minore evidenza nella diminuzione del consumo cellulare di ossigeno a scopo energetico, dal momento che questo, viene comunque consumato nelle reazioni di formazione di specie ossidanti. In altri termini, la riduzione del consumo di ossigeno fisiologico, dovuto alla respirazione cellulare, può venire in parte compensata dal suo utilizzo non mitocondriale, o più precisamente, viene utilizzato dalla cellula in reazioni collaterali che contribuiscono all'alterazione dell'omeostasi cellulare, portando ad uno squilibrio nel sistema antiossidante endogeno ed alla produzione di ROS e successivo danno cellulare.

Gli esperimenti di clearance dei due gas, hanno evidenziato differenze significative esclusivamente in merito all'ossigeno, mentre non sono state rilevate alterazioni nella clearance dell'idrogeno, né in condizioni fisiologiche né nelle cellule trattate con MPP⁺. Il potere riducente dell'antiossidante gassoso H₂, risulta indirizzato a forti specie ossidanti, quali per esempio il radicale idrossile e il perossinitrito (Otha 2014). La neurotossina MPP⁺ induce la produzione di ROS quali soprattutto anione superossido e perossido di idrogeno (Przedborski et al 2000, Arif and Khan 2011). che non risultano substrato dell'idrogeno molecolare, per via della loro relativa ridotta capacità pro-

ossidante nei confronti dell'H₂. Quanto detto, giustifica l'impossibilità nel presente dispositivo, di rilevare un consumo di idrogeno da parte delle cellule, sia in condizioni fisiologiche che a seguito del trattamento con MPP⁺. La produzione di gas mediante elettrolisi non influenza la vitalità cellulare che, dopo gli esperimenti, è paragonabile a quella dei controlli.

La semplice interpretazione dei risultati, la relativa economicità del dispositivo e la possibilità di un monitoraggio continuo e in tempo reale delle variazioni di parametri come flusso ematico cerebrale e consumo neuronale di ossigeno, sono alcuni dei vantaggi del modello di studio presentato.

Le componenti funzionali del dispositivo, grazie alle ridotte dimensioni (sensori per l'O₂, l'H₂ ed elettrodi per la elettrolisi *in situ* dei gas: $\varnothing < 200\mu\text{m}$), consentirebbero l'applicazione in vivo della tecnica analitica, fornendo un utile sistema per lo studio *in vivo* di modelli animali di patologie neurodegenerative come Parkinson e Alzheimer.

La possibilità di regolare la concentrazione dei gas a livello extracellulare, rende il prototipo in questione ideale come modello per lo studio di modelli di ischemia riperfusione, valutazione del danno ischemico a seguito di riperfusione e di un eventuale protezione indotta da un preconditionamento ischemico.

L'intera indagine analitica, può essere effettuata attraverso un monitoraggio continuo ed è possibile trasferire le informazioni elettrochimiche provenienti dai microsensori, via bluetooth, attraverso l'impiego di un sistema telemetrico già validato (Rocchitta et al., 2013), con il vantaggio di eseguire gli studi in maniera completamente autonoma e indipendente da qualsiasi apparecchiatura fissa.

Il controllo del flusso ematico cerebrale e delle variazioni del consumo di ossigeno, potrebbe essere esteso al monitoraggio di altri substrati e prodotti del metabolismo energetico, come il glucosio, il lattato, il piruvato, quindi ottenere un quadro più dettagliato dell'equilibrio tra un metabolismo aerobico e uno anaerobico. Inoltre si potrebbe correlare il monitoraggio del flusso

ematico regionale cerebrale con le variazioni dei neurotrasmettitori come catecolamine, glutammato e nitrossido molto importanti nello studio dei modelli patologici.

6 RIASSUNTO

Il corretto apporto e consumo di ossigeno, quale substrato energetico fondamentale per il metabolismo cellulare sono condizioni imprescindibili per il mantenimento delle condizioni di salute di un individuo.

Il corretto utilizzo dell'ossigeno nella sua forma molecolare O_2 è altresì importante, in virtù della sua potenziale attività ossidante, che si osserva quando vengono alterati gli equilibri fisiologici. (Tanriverdi et al., 2006 e Grassi et al., 2010).

L' O_2 molecolare infatti, può venire trasformato in derivati tossici per la cellula e compromettere, in funzione della sua entità, l'equilibrio endogeno tra sistema antiossidante e agenti pro-ossidanti, provocando e alimentando condizioni patologiche e malattie di varia natura accomunate da un danno riconducibile ad uno stress ossidativo. Alterazioni del flusso ematico in aree importanti come cuore e cervello, sono cause di infarti ed ictus, inoltre, alcune tra le più diffuse patologie neurodegenerative come Parkinson e Alzheimer, sono riconducibili ad alterazioni dell'apporto energetico tramite il sangue, in precise aree del cervello.

La possibilità di effettuare un monitoraggio continuo *real-time* (in condizioni fisiologiche e in seguito a condizioni patologiche indotte o preesistenti), di parametri importanti come il flusso ematico, la distribuzione dell'ossigeno nei distretti anatomici di maggiore interesse e il consumo di ossigeno, consente di studiare in maniera approfondita il metabolismo energetico e lo stato di salute di un organo e di un organismo nel suo complesso.

Il dispositivo descritto in questa tesi, fondato su un approccio multidisciplinare, vuole essere una proposta di un valido modello di riproduzione, *in vitro*, di un sistema biologico dinamico, ideale per lo studio delle funzioni energetiche cellulari e neuronali.

Il funzionamento del dispositivo, è basato sul monitoraggio elettrochimico di substrati energetici importanti come l' O_2 , ma estendibile anche a numerose

altre molecole utilizzabili come *target* di svariate patologie a carico del sistema nervoso centrale comprese le patologie neurodegenerative.

La possibilità di modulare mediante elettrolisi, la disponibilità di O₂ extracellulare, unita alla capacità del dispositivo di misurare le fluttuazioni di O₂ e H₂, fa del sistema un modello ideale di ischemia/riperfusione, sul quale studiare i danni indotti dalla riperfusione a seguito di ischemia e valutare l'entità di una prevenzione derivata da un preconditionamento ischemico.

Il microsensore per l'idrogeno, consente inoltre di approfondire il ruolo di questo gas (fino a poco tempo fa considerato inerte), come *scavenger* di molecole altamente ossidanti come il radicale idrossilico e il perossinitrito, responsabili dello stress ossidativo che porta alla morte cellulare.

7 BIBLIOGRAFIA

- Abou-Sleiman PM.**, Muqit MM, and Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 7: 207–219, 2006.
- Annat G.**, VIALE J.P., PERCIVAL C., FROMANT M., MONIT J. "Oxygen delivery and uptake in the adult respiratory distress syndrome" *Am. Rev. Respir. Dis.*, 133, 999-1001, 1986
- Aukland K.**, Bower BF., Berliner RW. Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Circ Res*: 164-187, 1964.
- Aukland K.**, Hydrogen polarography in measurement of local blood flow, theoretical and empirical basis. *Acta Neurol*: 42-44, 1965.
- Baas AS.**, and Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 77: 29–36, 1995.
- Bazzu G.**, Puggioni GG, Dedola S, Calia G, Rocchitta G, Migheli R, Desole MS, Lowry JP, O'Neill RD, Serra PA. Real-time monitoring of brain tissue oxygen using a miniaturized biotelemetric device implanted in freely moving rats. *Anal Chem*. Mar 15;81(6):2235-41. 2009
- Blokhina O.**, Virolainen E, and Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 91(spec no): 179–194, 2003.
- Bolger FB.**, Lowry JP. Brain Tissue Oxygen: In Vivo Monitoring with Carbon Paste Electrodes. *Sensors*: 473-487, 2005.
- Buchwald H.**, O'Dea TJ, Menchaca HJ, Michalek VN, and RohdeTD. Effect of plasma cholesterol on red blood cell oxygen transport. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27: 951–955, 2000.
- Buettner GR.**, Ng CF, Wang M, Rodgers VG, and Schafer FQ. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radic Biol Med* 41: 1338–1350, 2006.

Calia G., Rocchitta G., Migheli R., Puggioni G., Spissu Y., Bazzu G., Lowry JP., O'Neill RD., Desole MS., Serra PA. Biotelemetric Monitoring of Brain Neurochemistry in Conscious Rats Using Microsensors and Biosensors. *Sensors (Basel)*: 2511–2523, 2009.

Calia, G., Rocchitta G., Migheli R., Puggioni G., Spissu Y., Bazzu G., Mazzarello V., Lowry J.P., O'Neill R.D., Desole M.S. Biotelemetric monitoring of brain neurochemistry in conscious rats using microsensors and biosensors. *Sensors*, 2009.

Carini M., Aldini G, Orioli M, Piccoli A, Rossoni,G. Maffei Facino Nitric oxide release and distribution following oral and intraperitoneal administration of nitroaspirin (NCX 4016) in the rat *Life Sciences - LIFE SCI* , vol. 74, no. 26, pp. 3291-3305, 2004.

Clark D.D., Sokoloff L. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, ed. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Philadelphia: Lippincott. pp. 637-670, (1999).

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

Faraci F.M., Heistad D.D. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*, 78: 53–97, 1998.

Folino A.F., Cerebral Autoregulation and Syncope *Original Research Article Cerebral*

Freeman BA., Oxygen: the air-borne nutrient that both sustains and threatens life. *Nutrition* 16: 478–480, 2000.

George C., Cotzias. MPTP A neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease: The 1985. *Lecture Neurology* vol. 36 no. 2: 250,1986.

Giordano S., Lee J., Darley-USmar VD., Zhangmail J. Distinct Effects of Rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on Cellular Bioenergetics and Cell Death. *Published*, 2012.

- Grassi, D.;** Desideri G., Ferri L., Aggio A., Tiberti S., Ferri C., Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction: Say NO to Cigarette Smoking Current Pharmaceutical Design, Volume 16, Number 23, August 2010, pp. 2539-2550(12)
- Groves JT.,** The bioinorganic chemistry of iron in oxygenases and supramolecular assemblies. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 3569–3574, 2003.
- Han JF.,** Wang SL, He XY, Liu CY, and Hong JY. Effect of genetic variation on human cytochrome p450 reductase-mediated paraquat cytotoxicity. Toxicol Sci 91: 42–48, 2006.
- Härmä M.,** Kompier MAJ, Vahtera J Work-related stress and health—risks, mechanisms and countermeasures Scandinavian Journal of Work, Environment & Health;32(6):413-419, 2006
- Hastings TG. J.** The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. Bioenerg Biomembr. 41(6):469-72, 2009.
- Hastings TG.,** Bioenerg J. The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. Biomembr. 41(6):469-72, 2009.
- He H.,** Huy LAP., Dramou P., Xiao D., Zuo P., Pham C.-Huy. Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. BioMed Research International, 2013.
- Hoshi T.,** Lahiri S. Cell biology: oxygen sensing: It's a gas! Science 306: 2050–2051, 2004.
- Izumi Y.,** Ezumi M, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T. Endogenous dopamine is involved in the herbicide paraquat-induced dopaminergic cell death. Toxicol Sci. 2014 Jun;139(2): 466-78. EpubApr 17 2014.
- Jiao L.,** Zhang L. , Wang X., Diankov G., Dai H.: Narrow graphene nanoribbons from carbon nanotubes. Nature 458: 877-880, 2009.
- 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: 669–677, 2007.
- Kety SS.,** The physiological and physical factors governing the uptake of anesthetic gases by the body. Anesthesiology :517-26, 1950.

Kety SS., Schmidt CF, J Clin. The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: theory, procedure and normal values. Invest :476-83,1948.

Kety SS., Schmidt CF. The determination of cerebral blood flow in man by use of nitrous oxide in low concentrations. Am J Physiol 143: 53_65, 1945.

Kety SS., Schmidt CF. The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: Theory, procedure and normal values. J Clin Invest 27: 476–483, 1948.

Lahiri S., Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, and Prabhakar NR. Oxygen sensing in the body. Prog Biophys Mol Biol 91: 249–286, 2006.

Landau WM., Freygang WH.Jr., Roland LP., Sokoloff L., Kety SS. The local circulation of the living brain: values in the unanesthetized and anesthetized cat. Trans Amer Neurol Assoc :125, 1955.

Lane N., Oxygen: the molecule that made the world. Oxford: Oxford University Press, 2002.

Leniger-Follert E.,Lobbers DW. Behavior of microflow and local O₂ of the brain cortex during and after direct electrical stimulation. Pflugers Arch Eur J Physiol 366: 38-44, 1976.

Lenzi P., Zoccoli G, Walker AM, and Franzini C. Cerebral circulation in REM sleep: is oxygen a main regulating factor? Sleep Res Online 3: 77–85, 2000.

Lowry J.P., Fillenza M., Tomita M., Takeda H. 2001

Lowry J.P., Fillenz M. Real-time monitoring of brain energy metabolism in vivo using microelectrochemical sensors: the effects of anesthesia. Bioelectrochemistry: 39–47, 2001.

Lowry J.P., Martyn G., Boutelle B., Fillenz M. Measurement of brain tissue oxygen at a carbon paste electrode can serve as an index of increases in regional cerebral blood flow. Journal of Neuroscience Methods: 177–182, 1997.

Mandelker L., The natural activities of cells: the role of reactive oxygen species, and their relation to antioxidants, nutraceuticals, botanicals, and other biologic therapies. Vet Clin North Am Small Anim Pract 34: 39–66, 2004.

- Mangold R.**, Sokoloff L., Conner E., Kleinerman J., Therman PO., Kety SS., Clin J. The effects of sleep and lack of sleep on the cerebral circulation and metabolism of normal young men Invest :1092-1100, 1955.
- 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. Anal. Biochem 380: 323–330, 2008.
- 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:323, 2008.
- Moldovan L.**, and Moldovan NI. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. Histochem Cell Biol 122: 395–412, 2004.
- Muchada R**, Rinaldi A, Cathignol D. Non-invasive monitoring of hemodynamic profile during general anesthesia. Minerva Anestesiol. Jun;56(6):199-205, 1990.
- Niteen Tapuria M.S.**, Yogesh Kumar F.R.C.S., Meer Mohammad Habib M.R.C.S, Mahmoud Abu Amara F.R.C.S., Alexander M., Seifalian Ph.D., Brian R., Davidson M.D. A Novel Protective Method From Ischemia Reperfusion Injury, A Review Journal of Surgical Research 304–330, 2008.
- Ormonde**, O'Neill The oxidation of ascorbic acid at carbon paste electrodes: Modified response following contact with surfactant, lipid and brain tissue, 1990.
- Ohta S.** Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. Biochim Biophys Acta. 2012 May; 1820(5):586-94, 2011.
- Paulson O.B.**, Strandgaard S., Edvinsson L. Cerebral autoregulation Cerebrovasc Brain Metab Rev. 2: 161–192, 1990.
- Pittman RN.** Regulation of Tissue Oxygenation. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences;. Chapter 8, Matching Oxygen Supply to Oxygen Demand. 2011.

- Prabhakar NR.**, Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. *J Appl Physiol* 88: 2287–2295, 2000.
- Przedborski S.**, Jackson-Lewis V., Djaldetti R., Liberatore G., Vila M., Vukosavic S., Almer G. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci*: 135-142, 2000.
- Qureshi A.**, Kang WP., Davidson JL., Gurbuz Y. Review on carbon-derived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications. *Diamond and Related Materials*: 1401–1420, 2009.
- Reivich M.**, Kuhl D., Wolf A. The 18F fluoride-oxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man *Circ Res*, 44: 127–137, 1979.
- Riera JJ**, Watanabe J, Kazuki, I Naoki M, Aubert A state-space model of the hemodynamic approach: nonlinear filtering of BOLD signals *NeuroImage*, 2004.
- Rocchitta G.**, Secchi O, Alvau MD, Farina D, Bazzu G, Calia G, Migheli R, Desole MS, O'Neill RD, Serra PA. Simultaneous telemetric monitoring of brain glucose and lactate and motion in freely moving rats. *Anal Chem*. 2013 Nov 5;85(21), 2013.
- Roy S.**, Khanna S, Wallace WA, Lappalainen J, Rink C, Cardounel AJ, Zweier JL, and Sen CK. Characterization of perceived hyperoxia in isolated primary cardiac fibroblasts and in the reoxygenated heart. *J Biol Chem* 278: 47129–47135, 2003.
- Sayagoa, I.**, Terradob E. Lafuenteb, E. Gutierrez J, Hydrogen sensors based on carbon nanotubes thin films *Synthetic Metals* Volume 148, Issue 1, 3 January 2005, Pages 15–19.
- Sen CK.**, Khanna S, and Roy S. Perceived hyperoxia: oxygen-induced remodeling of the reoxygenated heart. *Cardiovasc Res* 71: 280–288, 2006.
- Sieck GC.** Oxygen sensing in health and disease. *J Appl Physiol* 96: 1–2, 2004.
- Silva A.C.**, KimS.G. Perfusion-based functional magnetic resonance imaging *Concepts Magn Reson Part A*, 16A: 16–27, 2003.

- Silver I.A.**, Some observations on the cerebral cortex with an ultra-micro, membrane covered, oxygen electrode. *Med. Electron. Biol. Engng* 3: 377–387, 1965.
- Simonian NA.**, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 83–106, 1996.
- Snyder J.V.**, PINSKY M.R. "Oxygen transport in the critically ill" Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago, 1987
- Storz P.**, Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 10: 1881–1896, 2005.
- Strandgaard S.**, Paulson O.B. Cerebral autoregulation. *Stroke*, 15: 413–416, 1984.
- Stryer, L** Biochemistry (fourth ed.). New York – Basingstoke: W. H. Freeman and Company. ISBN 978-0716720096 1995.
- Suehiro J.**, Kyushu U., Fukuoka, Yamane S., Imasaka K. Carbon Nanotube-Based Hydrogen Gas Sensor Electrochemically Functionalized with Palladium, 2007.
- Taizo N.**, , Akitane A. Differential time courses of exogenous 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and its metabolite MPP+ in the rat striatum and nucleus accumbens measured using in vivo voltammetry *Brain Research* Volume 812, Issues 1–2, 23 November, Pages 150–156, 1998.
- Tang Q.**, Shan Z., Wang L., Qin X., Zhu K., Tian J., Liu X., Nafion coated sulfur–carbon electrode for high performance lithium–sulfur batteries *Journal of Power Sources* Volume 246, , Pages 253–259 15 January 2014.
- Testa CM.**, Sherer TB., Greenamyre JT. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 2005 Mar 24;134(1):109-18. Epub Jan 6 2005.
- Thiruchelvam M.**, Richfield EK., Baggs RB., Tank AW., Cory-Slechta DA. J The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *Neurosci.* Dec 15;20(24):9207-14, 2000.

Wechsler RL., Dripps RD., Kety SS. Blood flow and oxygen consumption of the human brain during anesthesia produced by thiopental. *Anesthesiology* :308-14, 1951.

Westerink RHS.,Ewing AG. The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol* 192(2): 273-285, 2008.

Wink DA., Miranda KM., Espey MG., Pluta RM., Hewett SJ., Colton C., Vitek M., Feelisch M, Grisham MB. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. :203-13,2001.

Winyard PG., Moody CJ, and Jacob C. Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sci* 30:453–461, 2005.

Wong Y.M., Kang, W.P. Davidson J.L. Wisitsora-at A., , Soh K.L. A novel microelectronic gas sensor utilizing carbon nanotubes for hydrogen gas detection *Sensors and Actuators B: Chemical* Volume 93, Issues 1–3, 1 August 2003.

Young W. H₂ clearance measurement of blood flow: a review of technique and polarographic principles. *Stroke* :552-564, 1980.

Zhan D, Jeyavel Velmurugan and Michael V. Mirkin Adsorption/Desorption of Hydrogen on Pt Nanoelectrodes: Evidence of Surface Diffusion and Spillover J. *Am. Chem. Soc.*, , 131 (41), pp 14756–14760, 2009