



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
BIOMEDICHE**

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Piana

INDIRIZZO IN NEUROSCIENZE

Responsabile di Indirizzo: Dott.ssa Rossana Migheli

XXVIII CICLO

**Monitoraggio real-time della neurochimica corticale
in topi liberi di muoversi durante il sonno, la
privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi
in vivo e neurosensori amperometrici**

Direttore:

Prof. Andrea Piana

Tutor:

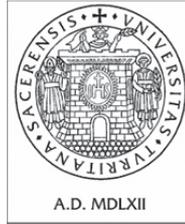
Prof. Pierandrea Serra

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Giovanna Maria Spano

Anno Accademico 2014 - 2015

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari



Durante i tre anni di Dottorato ho frequentato il laboratorio del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università degli Studi di Sassari ,per un periodo di 9 mesi il dipartimento di chimica applicata ed ingegneria dei composti inorganici ed ambientale dell'Università Politecnica di Timisoara ed, infine, per 6 mesi il laboratorio del Dipartimento di Psichiatria dell'Università Wisconsin-Madison

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Sommario

Introduzione	2
Caratteristiche del ciclo sonno veglia.....	8
Regolazione del ciclo sonno veglia	13
Neurotrasmettitori coinvolti nella regolazione del ciclo sonno-veglia.....	16
Noradrenalina (NA)	17
Istamina.....	17
Serotonina	18
Acetilcolina	19
GABA	19
Ipocretina o Orexina	20
Glutammato	21
Dopamina.....	21
Acido Ascorbico	22
Scopo della ricerca	25
Materiali e Metodi.....	27
Costruzione e calibrazione del microsensore per l'Acido Ascorbico.....	28
Preparazione pasta in carbonanotubi	29
Costruzione della sonda microdialitica.....	31
Animali	32
Chirurgia stereotassica.....	32
Monitoraggio dell'acido ascorbico in tempo reale	34
Microdilisi.....	34
Esperimento di microdialisi	35
Analisi dei campioni mediante la tecnica HPLC/ORBITRAP	37
Istologia	37
Analisi statistica.....	37
Risultati	39
Caratterizzazione dei micro sensori per l'acido ascorbico	40

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Monitoraggio real-time dell'acido ascorbico nella corteccia prefrontale mediale di topi freely moving.....	42
Analisi metabolomica del fluido extracellulare di mPFC e M1	44
Piruvato.....	44
Tirosina	45
Acido omovanillico (HVA)	46
Taurina.....	49
Glutammato	49
Glutamina	51
Valine, Leucina/ Isoleucina	53
Acido urico	56
Acetoacetato	57
Conclusioni	60
Bibliografia	63

Introduzione

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Il ciclo sonno veglia comprende l'alternarsi di distinti stati fisiologici: la veglia, il sonno NREM (Non Rapid Eye Movement) e il sonno REM (Rapid Eye Movement). L'attività elettrica cerebrale (EEG) umana venne registrata per la prima volta, nel 1928 dal medico tedesco Hans Berger, mostrando chiare differenze nell'individuo sveglio ed addormentato (Berger 1929). Nel 1949 venne dimostrato il ruolo della formazione reticolare del tronco encefalico nella transizione fra sonno (o sonnolenza) e veglia (o vigilanza e attenzione), mostrando una associazione tra sincronizzazione e desincronizzazione dell'EEG (Moruzzi and Magoun 1995).

Il sonno è stato definito come uno stato comportamentale reversibile della percezione con conseguente distacco e insensibilità all'ambiente circostante, risultante da un complesso insieme di processi fisiologici e ambientali (Carskadon 2011).

Per secoli l'umanità si è interrogata su quale fosse lo scopo del sonno e, ancora oggi, questo è un mistero per la biologia. La comprensione di tali meccanismi, osservati in tutto il mondo animale (Brown 2012), è di grande interesse per la comunità scientifica poiché disturbi del sonno sono associati a diverse condizioni patologiche. Sebbene siano stati compiuti numerosi passi avanti nello studio e nella comprensione dei meccanismi cerebrali che sottendono al ciclo sonno-veglia le funzioni del sonno sono ancora irrisolte (Brown 2012). Gli approcci alla spiegazione delle sue funzioni sono molteplici e uno tra questi è quello filogenetico. Diversi studi mostrano come tutti i mammiferi, gli uccelli e i rettili siano impegnati nel sonno, mentre, per quanto riguarda anfibi, pesci ed invertebrati non ci siano prove certe. È intuitivo che il sonno si sia evoluto dalla veglia ma non è chiaro quale dei due, tra il sonno NREM o SWS (sonno ad onde lente) e REM si sia sviluppato per primo. Comprendere la sequenza con cui tali fenomeni si sono generati potrebbe aiutarci nella comprensione della o delle funzioni del sonno. Dal punto di vista evuzionistico sono state proposte principalmente tre ipotesi riguardanti lo sviluppo del ciclo sonno veglia (Lesku

2006) Fig.1. Nella prima ipotesi *SWS-first* viene assunto come sonno ancestrale il SWS.

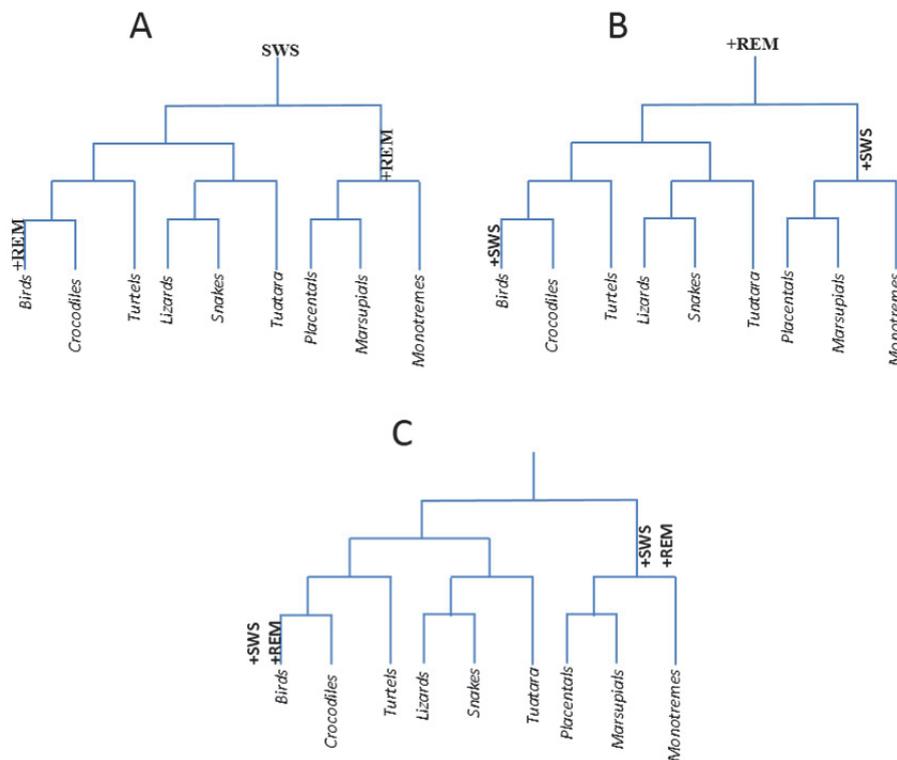


Figura 1. Tre ipotesi per l'origine evolutiva del SWS e REM.

stabilendo una successiva comparsa del sonno REM che si sarebbe evoluto separatamente negli uccelli (e nei loro antenati dinosauri) e nei mammiferi marsupiali (Flanigan 1973; Flanigan, Wilcox et al. 1973). A supporto di questa prima ipotesi ci sono studi svolti su monotremi in particolare *echidna tachyglassus* (mammiferi ovipari)(Allison, Van Twyver et al. 1972).

REM sleep first è la seconda ipotesi proposta, secondo cui il sonno ancestrale è rappresentato dal sonno REM e il SWS deriverebbe da una successiva e concomitante evoluzione del fenomeno nei mammiferi e negli uccelli (Siegel, Manger et al. 1998). Numerose evidenze hanno consentito di formulare tale ipotesi da cui nascono diverse conclusioni: A) Durante il sonno REM i

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

meccanismi di termoregolazione endotermica sono sospesi o compromessi. Supponendo che il sonno REM sia stato la prima forma ancestrale di sonno manifestatasi nei rettili, questi, essendo animali eterotermi non sarebbero stati influenzati negativamente dall'inibizione della termoregolazione. Tuttavia, con l'evoluzione endotermica, il sonno REM non era più compatibile con la sopravvivenza, portando alla comparsa del sonno ad onde lente (SWS) che consente la termoregolazione in concomitanza con il sonno.

B) Per poter confermare l'ipotesi *REM sleep first* può essere considerata l'ontogenesi del ciclo del sonno. Lo stato REM è la tipologia di sonno dominante nel feto di un mammifero. Dopo la nascita, si ha una graduale riduzione del sonno REM fino al raggiungimento dei livelli adulti ed un concomitante incremento del SWS e della veglia. C) Infine, mentre nei mammiferi le onde lente sono propagate a partire dalla neocorteccia, il sonno REM origina dal ponte, una struttura del tronco encefalico la più antica della porzione cerebrale caudale. Perciò l'evoluzione del ciclo SWS/REM potrebbe avere avuto inizio con il sonno REM e non con il SWS come si pensava. L'assenza di sonno REM nei rettili esistenti rappresenta un importante punto di debolezza di questa ipotesi, tuttavia, il sonno REM o stato sonno REM-simile può essere molto sensibile alla temperatura così come nei mammiferi e ulteriori studi consentirebbero di poter meglio chiarire tale punto (Lesku 2006).

La terza ipotesi prevede *l'evoluzione contemporanea dei 2 meccanismi* nei mammiferi e negli uccelli e nessuna ereditarietà dai rettili che presentano una storia di SWS e REM controversa (Siegel, Manger et al. 1999).

Secondo alcuni autori, la visione evolucionistica non spiega facilmente la notevole variabilità interspecie delle quote di sonno tra i mammiferi (Tononi and Cirelli 2006), in virtù di ciò sono state proposte ulteriori ipotesi volte a spiegarne la funzione.

Durante il giorno vi è un aumento del dispendio energetico che si riduce durante la notte, in particolare durante il sonno, di circa il 5-25% consentendo in questo modo un recupero energetico. Ciò costituisce la base di una delle teorie che

cercano di spiegare perché dormiamo: *conservazione dell'energia*. Durante le prime ore del sonno si osserva una riduzione del consumo di ossigeno, della frequenza cardiaca e della temperatura corporea in associazione con la comparsa del SWS. Esiste una relazione inter-specie tra tasso metabolico e modello di sonno; ci sono prove secondo cui individui che possiedono un tasso metabolico diurno elevato hanno più sonno ad onde lente e dormono più a lungo rispetto a quelli con tassi metabolici più bassi. Inoltre, le persone che dormono per un lungo periodo durante il giorno presentano elevata temperatura corporea, con conseguente elevato tasso metabolico.

Un elevato dispendio di energia durante il giorno, dopo intensa attività fisica, è associato sia con una maggiore durata del sonno che con un incremento del sonno ad onde lente. La privazione del sonno è seguita da un incremento nella quantità di sonno ad onde lente, probabilmente in seguito alla ritardata riduzione del tasso metabolico che accompagna normalmente il sonno. In sintesi, secondo tale teoria, la primaria funzione del sonno è preservare energia (Shapiro and Flanigan 1993).

La teoria più diffusa sulla funzione del sonno è quella del *ristoro*. Ci sono due interpretazioni di questa ipotesi: totale ristoro corporeo e ristoro neurologico.

Secondo la prima ipotesi il sonno è un processo mediante il quale tutto il corpo (compreso il sistema nervoso centrale) può ripristinare le proprie funzioni. Questa teoria è confermata da numerose evidenze qui di seguito argomentate. Durante la veglia si osserva un aumento del consumo di ossigeno che si riduce durante il sonno ed in particolare durante il SWS con conseguente utilizzo del metabolismo anaerobio.

Bassi tassi metabolici durante il sonno consentono un netto aumento della concentrazione delle proteine che dipende da un incremento della sintesi e da una riduzione della loro degradazione. Sebbene i processi catabolici e anabolici avvengano continuamente, a seconda che il soggetto sia sveglio o addormentato si verifica una variazione dei tassi relativi

La sintesi proteica prevale sulla degradazione delle proteine durante il sonno con conseguente aumento della concentrazione di ATP, tali osservazioni sono

supportate dalla constatazione che, durante il sonno, si ha un picco della mitosi cellulare. Oltre ad attribuire al sonno una generica funzione ristorativa è stato ipotizzato che le due diverse tipologie a loro volta possano svolgere una specifica funzione. Il SWS sembrerebbe essere importante per la sintesi macromolecolare ed il sonno REM per la rimozione dei prodotti di sintesi del SWS così da mantenere le connessioni sinaptiche. Il sonno REM sembrerebbe, anche, necessario per la formazione di connessioni neuronali del sistema catecolaminergico, funzione essenziale per il mantenimento delle funzioni cognitive.

Nella teoria del ristoro neurologico è il cervello e non il corpo a recuperare e il sonno andrebbe ad antagonizzare gli effetti del metabolismo cerebrale diurni. Alcuni ricercatori sostengono che i cambiamenti nella funzione fisiologica che sembrano accompagnare il sonno possono essere interconnessi tra loro, ma non sono necessariamente interdipendenti.

È stato, inoltre, ipotizzato che l'incremento del sonno ad onde lente osservato in seguito ad intensa attività fisica può essere spiegato con un aumento del metabolismo e della temperatura cerebrale. In virtù di tutte queste evidenze è stata avanzata l'idea che ci siano due sistemi di sonno che iniziano contemporaneamente e, insieme, determinano sia il ristoro cerebrale che il risparmio energetico. Il primo sistema è noto come "*sleep core*" in cui il sonno ad onde lente e il sonno REM si occupano di "riparare" gli effetti cerebrali diurni. Durante la notte il fenomeno dello "sleep core" si riduce gradualmente lasciando il posto al secondo "*optional sleep*" che promuove la conservazione energetica ed è sotto il controllo delle unità circadiane e comportamentali del sonno (Benington and Heller 1995).

Una nuova ipotesi è quella dell'*omeostasi sinaptica* secondo cui la plasticità sinaptica che si osserva durante la veglia comporta un netto aumento della forza sinaptica in molteplici circuiti cerebrali. Il ruolo del sonno sarebbe quello di ridurre la forza sinaptica generatasi, riportando i vari sistemi ad una linea di base e dunque ad un livello energeticamente sostenibile, che consenta un impiego

efficiente della materia grigia necessario per l'apprendimento e la memoria ed in particolare per il consolidamento delle nuove informazioni acquisite (Tononi and Cirelli 2006).

SWS e il sonno REM hanno funzioni complementari nell'ottimizzare il consolidamento della memoria. Durante il SWS vi è una attiva integrazione delle informazioni, recentemente codificate, con la memoria a lungo termine già esistente, inducendo, così, modificazioni conformazionali nelle rispettive rappresentazioni. Il consolidamento di questo sistema svolge la sua funzione di concerto con la riduzione della forza sinaptica necessaria ad impedire la saturazione delle reti sinaptiche. Il sonno REM, che sopraggiunge successivamente, sembrerebbe stabilizzare i ricordi precedentemente trasformati nel SWS permettendone un ulteriore consolidamento.

Dunque, il sonno è il prezzo che dobbiamo pagare affinché tutte queste funzioni e processi possano essere regolati (Tononi and Cirelli 2006; Diekelman 2010).

Caratteristiche del ciclo sonno veglia

Sia negli esseri umani che negli animali il ciclo sonno veglia può essere definito mediante la registrazione dell'attività elettrica di un grande gruppo di neuroni corticali e di cellule muscolari. L'elettroencefalogramma (EEG) può essere registrato mediante l'impiego di elettrodi posizionati a livello del cuoio capelluto, l'elettromiogramma (EMG) viene ottenuto attraverso il posizionamento di elettrodi al di sopra o nei muscoli scheletrici, infine, elettrodi posizionati vicino o sopra i muscoli responsabili dei movimenti oculari orizzontali consentono la registrazione dell'elettro-oculogramma (EOG). Inoltre, sono disponibili elettrodi cerebrali profondi che permettono la registrazione dell'attività di singole aree cerebrali o di singoli neuroni, queste ultime vengono dette registrazioni polisunnografiche (Brown 2012).

I ritmi EEG forniscono un quadro temporale delle funzioni cerebrali quali attenzione, formazione della memoria e la consapevolezza cosciente (Buzsaki and Draguhn 2004).

L'EEG della veglia tranquilla è caratterizzato dalla presenza di ritmi a bassa frequenza Gamma (30-120 Hz) e Beta (15-30 Hz) correlati a diverse aree corticali in particolare in seguito a stimoli sensoriali. Frequentemente i ritmi Gamma si verificano in concomitanza con ritmi Theta durante la veglia attiva ed il sonno REM (Canolty 2006), ma anche, durante la fase iniziale del sonno non REM (Steriade, Amzica et al. 1996). In alcuni studi, i ritmi Gamma sono stati suddivisi in due bande di frequenza: bassa Gamma (30-70 Hz) e alta Gamma (70-120 Hz), che sorgono in diversi strati corticali con differenti proprietà di modulazione farmacologica (Oke, Magony et al. 2010). Come già detto precedentemente, i ritmi Gamma si generano a livello corticale, tuttavia, la loro correlazione agli stimoli e allo stato comportamentale indica una loro dipendenza da input sottocorticali. Infatti, i ritmi Gamma sono correlati alla stimolazione della formazione reticolare mesencefalica che, a sua volta, rappresenta l'origine del sistema di attivazione reticolare ascendente (Herculano-Houzel. S 1999).

È stato ipotizzato che le oscillazioni Beta (15-30 Hz) non siano altro che delle oscillazioni gamma lente più efficaci dei ritmi Gamma nella sincronizzazione delle attività tra loci cerebrali lontani fra loro (Koppel 2000).

I ritmi Alpha, i primi ad essere descritti nell'EEG (Adrian 1935), possono essere osservati durante la veglia tranquilla a livello delle aree cortico-parietale, occipitale compresa la corteccia visiva primaria e scompaiono in seguito all'apertura degli occhi e a stimoli visivi. Si ritiene che questa tipologia di ritmi possa avere un ruolo molto importante nel pensiero, in particolare in situazioni in cui è necessario risolvere problemi aritmetici a livello mentale o nell'immaginazione visiva (Ray 1985). I meccanismi che sottendono alla genesi dei ritmi Alpha sono stati compresi solo di recente, essi risultano da una interazione fra i circuiti talamici e neocorticali insieme a moderati input colinergici provenienti dal tronco cerebrale (Lopes Da Silva and Storm Van Leeuwen 1977).

I ritmi Theta si generano, principalmente, durante la veglia e nei roditori sono associati al movimento mentre nell'uomo a compiti che richiedono memoria e attenzione; inoltre, in tutti i mammiferi sono presenti durante la fase REM (Kahana 2006). La funzione dei ritmi Theta, che si generano a livello ippocampale, non è ancora ben compresa, alcuni ritengono che la loro genesi sia legata al risveglio poiché molto spesso i ritmi Theta corticali sono accompagnati da una de sincronizzazione dell'EEG. Tuttavia, fra le teorie più popolari vi è quella che collega i ritmi Theta ai processi di apprendimento e memoria (Hasselmo 2005).

Il sonno NREM, nell'uomo, può essere suddiviso in diversi stadi in accordo con quanto stabilito da Rechtschaffen e Kales. Lo stadio 1 del sonno NREM è molto simile alla veglia tranquilla con onde Theta a livello frontale e ritmi Alpha a livello posteriore. Lo stadio 2 NREM presenta un EEG con Fusi (7-15 Hz) e complessi K. In questo stadio si osserva la comparsa periodica di gruppi di onde in sequenze di 1-2 sec con un ritmo lento di 0,1-0,3 Hz e con ampiezza crescente e decrescente. La loro genesi avviene a livello talamico, la comparsa e sincronizzazione viene regolata a livello corticale, inoltre, a queste formazioni si aggiunge anche il ruolo fondamentale svolto dal complesso reticolare nucleare GABAergico. I fusi rappresentano un processo di plasticità neuronale cioè un meccanismo attraverso il quale durante la fase NREM tutto ciò che è stato appreso durante la veglia viene consolidato. Gli stadi 3 e 4 del sonno NREM (sonno profondo) presentano onde Delta (1-4 Hz) e oscillazioni lente (<1 Hz) che si manifestano principalmente nella corteccia e nel talamo. Queste sono il risultato di un insieme di input eccitatori modulatori, principalmente colinergici e aminergici, che determinano un'iperpolarizzazione di membrana nei neuroni relay piramidali/talamici.

Le onde delta presentano una componente corticale caratterizzata dalla presenza di complessi K (caratteristici dello stadio 2 nella specie umana) ed una talamica risultante, in seguito ad iperpolarizzazione, dall'interazione fra le correnti intrinseche dei neuroni relay talamo-corticali. Durante le fasi più profonde del

sonno NREM, grazie all'aumento dell'iperpolarizzazione delle cellule talamo-corticali in seguito alla graduale riduzione della frequenza di scarica dei neuroni tronco encefalo-talamici (soprattutto colinergici), si ha una notevole riduzione della frequenza e dell'ampiezza dei fusi, mentre le onde delta talamiche aumentano. Quando ci si avvicina alla fine del sonno NREM, i fusi ricompaiono e questo sembrerebbe essere dovuto alla depolarizzazione delle cellule talamo-corticali in seguito ad un aumento nella frequenza di scarica da parte dei neuroni reticolari tronco encefalo-talamici-corticali che già circa 60 secondi prima dell'inizio del sonno REM mostrano un aumento nell'attività (Amzica 1992).

Il fenomeno delle oscillazioni lente (<1 Hz), descritto per la prima volta da Steriade nei gatti anestetizzati (Steriade, Nunez et al. 1993), venne successivamente osservato durante il normale sonno in animali e anche nell'uomo (Dang-Vu, Schabus et al. 2008). Queste sono un fenomeno corticale, registrazioni EEG umane hanno mostrato che ad ogni ciclo una oscillazione rappresenta un'onda che origina nella regione prefrontale e orbito-frontale per propagarsi verso le aree più posteriori corticali. Le oscillazioni lente si manifestano in tutte le fasi del sonno NREM consentendo di collegare fra loro tutti gli altri fenomeni come i fusi e le onde delta (Steriade 2006). Le oscillazioni lente, tuttavia, si occupano di collegare anche i ritmi rapidi che sono associati alla veglia e al sonno REM.

Il sogno che sopraggiunge principalmente durante il sonno REM per secoli ha incuriosito scrittori, artisti e scienziati. Nonostante ciò veniva semplicemente definito come uno stato cerebrale separato (Brown 2012). Esperimenti svolti Aserinsky, Dement, e Kleitmann negli uomini (Aserinsky 1953; Dement 1957) e Jouvet sugli animali (Jouvet 1962) mostrarono che il sonno REM viene definito da un insieme di caratteristiche toniche e fasiche dell'EEG e dell'EMG. Jouvet lo definì *Le sommeil paradoxal* poiché questo stato presenta un EEG che somiglia a quello della veglia ma è associato a paralisi muscolare.

Il sonno REM presenta un EEG con attività a frequenza mista e basso voltaggio. In un tipico EEG osserviamo la presenza di ritmi Theta che, a loro volta, vengono

distinti in Tipo I e II. Quelle di tipo I (4-7 Hz) sono state osservate in animali sotto anestesia o immobili e in cui era stato inibito l'olfatto mediante somministrazione di atropina solfato (un antagonista muscarinico). Il tipo I è un ritmo Theta ad elevata frequenza (7-12 Hz) osservato durante la veglia associata al movimento e vennero abolite mediante anestesia con uretano. I ritmi Theta che si registrano nella fase REM non sono altro che la combinazione delle due tipologie ritmiche.

Campi elettrici sincronizzati nel ponte, nel nucleo genicolato laterale e nella corteccia occipitale (detti onde PGO) si manifestano con elevata ampiezza e singolarmente nel periodo immediatamente precedente l'inizio del sonno REM (il periodo di transizione fra NREM e REM è di 30-90 sec) e con una ampiezza minore durante tutto il sonno REM (Bizzi 1963; Datta 1997). Le onde PGO vengono considerate la fonte dei sogni e dell'immaginazione visiva durante il sonno REM, poiché in corrispondenza di queste si verificano movimenti oculari e sono associati ai circuiti talamo corticali visivi (Brown 2012).

Nel sonno REM e nella veglia si può osservare l'attivazione dell'EEG che dipende da una semplificazione della trasmissione sinaptica attraverso stazioni di relè talamiche. I ritmi EEG di bassa frequenza potrebbero essere bloccati dalla formazione reticolare tronco encefalica. Infatti, sue proiezioni colinergiche andrebbero ad eccitare direttamente i neuroni talamo corticali inibendo i neuroni reticolari talamici e, di conseguenza, liberando dall'inibizione i neuroni talamo corticali. L'attivazione elettroencefalografica e l'eccitabilità neuronale sono, dunque, una conseguenza della depolarizzazione dei neuroni talamo-corticali in seguito ad una loro stimolazione colinergica. Questi processi sono alla base della transizione dallo stato di sonno a quello attivo, che presenta attività di scarica tonica e responsività a livello sinaptico. (Steriade 2005). Durante il sonno REM all'attivazione dell'EEG partecipa, oltre che la formazione reticolare rostrale, anche le proiezioni talamiche dei neuroni corticali bulbari. Questi ultimi aumentano la loro frequenza di scarica circa 30-60 secondi prima del primo segno di attivazione il passaggio dal ritmo sincronizzato del sonno NREM al sonno REM. Durante la veglia ed il sonno REM si ha un aumento dell'attivazione

colinergica della corteccia cerebrale. Il meccanismo che regola e determina tale fenomeno non è ancora ben chiaro, infatti, i neuroni talamo corticali utilizzano glutammato o aspartato ma non acetilcolina. Allo stesso tempo, sono state riscontrate proiezioni della formazione reticolare del tronco encefalico ai nuclei colinergici del prosencefalo basale. Questi ultimi possiedono proiezioni corticali diffuse, perciò, esistono due tipologie di attivazione dell'EEG una non colinergica talamo-corticale ed una colinergica proveniente dai neuroni del prosencefalo basale (Steriade 2005).

Regolazione del ciclo sonno veglia

L'importanza del ciclo sonno veglia viene realmente compresa quando confrontata con le conseguenze dovute ad una sua distruzione. Alterazioni del ciclo sonno veglia possono essere causati dal jet lag, da lunghi turni lavorativi che determinano una riduzione della qualità della vita, della salute e delle prestazioni. Disturbi del sonno si osservano anche in soggetti non vedenti, nelle persone anziane e in giovani individui che soffrono di disturbi circadiani del sonno, in virtù di ciò, è stato ipotizzato che gli orologi biologici (circadiani) possano avere un ruolo nella regolazione di tale ciclo e nei loro disturbi.

Recentemente numerosi studi hanno consentito di poter comprendere la funzione svolta dai ritmi circadiani e le tempistiche nella regolazione del ritmo sonno-veglia, in particolare, l'integrazione dei ritmi circadiani con processi endocrini e fisiologici.

Il ciclo sonno veglia umano non è esclusivamente regolato dal pacemaker circadiano localizzato a livello del nucleo soprachiasmatico, ma risulta dall'interazione fra diversi sistemi (DERK-JAN 2002). Questo modello venne introdotto per la prima volta nel 1980 dal ricercatore svizzero Alexander Borbély secondo cui

1) *l'omeostasi del sonno-veglia* o *Processo S* media l'aumento della "pressione del sonno" durante la veglia e la riduzione di questa durante il sonno. I tipici

markers di questo processo sono il sonno ad onde lente (SWS) e l'attività ad onde lente EEG (SWA). Nell'uomo SWA e SWS si riducono durante il riposo indipendentemente dalla fase circadiana in cui il sonno è sopraggiunto. La durata del SWS e SWA viene determinata da quanto tempo l'individuo ha speso nella veglia (Dijk, Beersma et al. 1987). La localizzazione di tale processo sembrerebbe essere distinta dal SNC ed essere diffusa, inoltre, ci sono importanti evidenze secondo cui sarebbe possibile poter monitorare l'omeostasi del sonno durante la veglia. È stato osservato che componenti a bassa frequenza nell'EEG aumentano durante la veglia in tutte le fasi circadiane. Se durante il giorno vengono effettuati dei brevi riposi si evidenzia una riduzione nell'EEG dell'attività a bassa frequenza (ciò è valido anche per SWA) indicando che, queste componenti, durante la veglia sono associate all'omeostasi del sonno. È interessante, inoltre, osservare che entrambi gli effetti della veglia e del sonno nell'EEG si presentano a livello dell'area frontale corticale cerebrale (Finelli, Baumann et al. 2000). È stata proposta una regolazione neurochimica del Processo S, più precisamente è stato ipotizzato il ruolo dell'adenosina come neuromodulatore dell'omeostasi del sonno. Durante la veglia prolungata si osserva l'aumento dei livelli di adenosina nel prosencefalo basale, a dimostrazione di ciò è stato osservato che la somministrazione in queste aree di adenosina induce il sonno (Basheer, Porkka-Heiskanen et al. 2000). Il ruolo svolto dall'adenosina in tale processo viene confermato anche dall'ampio uso del suo antagonista caffeina per poter vincere la sonnolenza. In topi è stato, inoltre, osservato che la cinetica dell'omeostasi del sonno è anche sotto controllo genetico. L'analisi quantitativa dei loci ha consentito di poter identificare regioni genomiche in cui sono presenti specifici geni che regolano i livelli di adenosina (Franken 2001) (fra questi ricordiamo il *Clock-gene* nel topo (Naylor, Bergmann et al. 2000) e *hPer2-gene* nell'uomo (Toh 2001)).

2) Un *processo circadiano* o *Processo C* cioè un meccanismo orologio-simile che regola l'alternanza dei periodi con alta o bassa propensione al sonno essendo comunque indipendente dalla veglia o sonno precedente (Borbely and Achermann

1992). Nell'uomo il Sistema Nervoso Centrale (SNC) genera un segnale eccitatorio o di veglia che incrementa la sua forza durante il giorno, raggiungendo un picco nelle ore serali (22:00) e si riduce durante la notte biologica, raggiungendo il livello minimo nelle prime ore del mattino (06:00 h). In assenza del segnale eccitatorio circadiano il ciclo monobasico sonno-veglia scompare e viene sostituito dal ciclo polibasico, probabilmente stabilito dall'omeostasi del sonno. Il pacemaker circadiano garantisce il mantenimento ed il consolidamento della tempistica sonno-veglia opponendosi ad un aumento (omeostatico) della necessità di dormire più a lungo dovuta a una veglia prolungata (Dijk and Czeisler 1994). Il ritmo circadiano endogeno può variare in relazione al fotoperiodo cioè alla lunghezza del giorno, infatti, in seguito ad una prolungata esposizione all'oscurità la notte biologica aumenta (Wehr 1996). I ritmi circadiani potrebbero essere neuronali e/o umorali, difatti, la propensione a dormire può essere correlata alla variazione dei livelli plasmatici di melatonina (Dijk and Cajochen 1997). Tuttavia studi neuro anatomici, effettuati sui ratti, mostrano come efferenze del SNC trasmettano informazioni circadiane modulando diversi sistemi tra cui quello serotoninergico, adrenergico, orexinergico e istaminergico. La narcolepsia, un importante disturbo del sonno in cui i pazienti sono incapaci di mantenere la veglia presentando una continua sonnolenza e attacchi di sonno diurni, sembrerebbe essere causata da un deficit nel sistema orexinergico. Edgar e colleghi dimostrarono che nei pazienti narcolettici la forza del segnale promuovente la veglia sembrerebbe essere attenuato, al contrario, la regolazione del sonno è normale. Questi studi indicano un coinvolgimento dell'orexina (Abrahamson, Leak et al. 2001) nel sistema effettore circadiano (Dantz, Edgar et al. 1994).

3) Il processo ultradiano avviene all'interno del sonno stesso e determina l'alternanza dei due stati del sonno REM e NREM (Borbely and Achermann 1992).

4) La fotorecezione circadiana cioè la regolazione proveniente dal naturale ciclo luce buio.

Tutti questi processi partecipano alla regolazione del ciclo sonno veglia ma, allo stesso tempo, mediante feedback vengono a loro volta regolati dal ciclo stesso (Shapiro and Flanigan 1993) (Shapiro and Flanigan 1993).

Il processo circadiano sonno-veglia è il risultato dell'input proveniente da numerosi stimoli quali la luce, il rilascio di melatonina e l'attività al nucleo soprachiasmatico. Durante il giorno il sistema di omeostasi del sonno aumenta (cioè aumenta la pressione nell'andare a dormire) ed il processo circadiano diminuisce fino ad arrivare ad un punto in cui il promotore ventrolaterale preottico del sonno (VLPO) si attiva portando alla liberazione del neurotrasmettitore GABA nel nucleo tubero mamillare (TMN) inibendo, così, la veglia. Viceversa durante la notte il processo di omeostasi del sonno si riduce ed aumenta quello circadiano inibendo il sonno e portando al risveglio (Stahl 2012).

Neurotrasmettitori coinvolti nella regolazione del ciclo sonno-veglia

Diversi sistemi neurochimici cerebrali, modulano una grande varietà di cambiamenti elettrofisiologici che stanno alla base del ciclo sonno-veglia. Numerose popolazioni neuronali localizzate a livello ipotalamico e del tronco encefalico promuovono la veglia mediante l'azione di alcuni neurotrasmettitori quali la serotonina, l'istamina, l'orexina e la noradrenalina. La genesi e la manutenzione è possibile grazie al sincro contributo di tutti questi sistemi. Nonostante ognuno di questi agisca in modo unico e specifico, nessun neurotrasmettitore sembrerebbe essere assolutamente necessario, in quanto, la veglia non è totalmente inibita in seguito all'essenza di uno di essi. D'altra parte i neuroni presenti nel tronco encefalico e nell'ipotalamo sono coinvolti nell'avvio e nella conservazione del sonno. Queste popolazioni neuronali contengono neurotrasmettitori quali GABA ed acetilcolina e proiettano ai nuclei responsabili della regolazione della veglia. Numerosi neurotrasmettitori costituiscono un circuito neuronale con differenti caratteristiche la cui interazione agisce modulando (Franco-Pérez 2012)

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Noradrenalina (NA)

Negli anni '60 Jouvet e collaboratori condussero uno studio pionieristico riguardante il sonno e la veglia. Attraverso questo studio dimostrarono la presenza di neuroni noradrenergici a livello del *locus coeruleus* (LC) del ponte. Venne osservato come lesioni elettrolitiche nel LC potevano interrompere il sonno REM e a seconda dell'estensione di tale lesione si poteva ottenere la completa soppressione di tale stato. Mediante ulteriori studi venne dimostrato che il LC è il principale sito da cui partono terminazioni efferenti che determinano l'innervazione noradrenergica di tutte le strutture cerebrali anteriori (Lee, Beak et al. 2009). I Neuroni del LC possiedono un'attività stato dipendente cioè hanno un elevato tasso di scarica durante la veglia, che è inesistente durante il SWS e completamente inattivo durante il sonno REM (Aston-Jones and Bloom 1981). I neuroni noradrenergici del LC sembrerebbero essere un elemento chiave nel regolare il risveglio e la veglia. Studi farmacologici hanno dimostrato che mediante infusione diretta di NA o dei suoi agonisti (come l'isoprotenerolo e il clenbuterolo) in regioni innervate dai neuroni noradrenergici, come per esempio il nucleo settale mediale, aumenta la veglia totale (Berridge 2008). In sperimentazioni effettuate sui ratti è stato, inoltre, osservato che mediante la somministrazione di farmaci antagonisti dei recettori noradrenergici si ha un aumento dell'attività ad onde lente e del sonno REM nell'EEG (Pal and Mallick 2006). I farmaci che impediscono la ricaptazione o stimolano il rilascio della NA vengono utilizzati nel trattamento della ipersonnolenza, della narcolessia e dell'apnea ostruttiva del sonno perché sono in grado di aumentare o prolungare la veglia (Kumar 2008). In conclusione, tutte queste evidenze sperimentali mostrano un coinvolgimento della NA nella regolazione della veglia.

Istamina

I neuroni istaminergici sono localizzati a livello dell'ipotalamo posteriore e i loro assoni proiettano verso gran parte del SNC e svolgono un ruolo importantissimo nel mantenimento della veglia. È ormai ampiamente noto come lesioni in questa

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

regione causino uno stato comatoso-simile con continua sonnolenza ed, al contrario, lesioni al prosencefalo basale e all'ipotalamo anteriore causino insonnia persistente. I neuroni GABAergici inibiscono direttamente e fortemente i neuroni istaminergici dell'ipotalamo posteriore (Siegel 2004). I neuroni istaminergici sono attivi durante la veglia e silenti durante il SWS ed il sonno REM. Nel cervello sono presenti tre tipi di recettori istaminergici ed è stato osservato che mediante stimolazione farmacologica di H1 e H2 si ha un incremento della veglia e la scomparsa del SWS e del sonno REM. IL recettore H3 controlla l'attività istaminergica neuronale attraverso l'auto inibizione pre-sinaptica. La modulazione di questi tre recettori e dei loro ligandi determinerebbe il mantenimento dello stato di veglia . I neuroni istaminergici appaiono strettamente correlati alla veglia e una loro inattivazione dovuta all'azione GABAergica è fortemente correlata alla sonnolenza , come si evince anche dall'osservazione che farmaci antistaminici che attraversano la barriera ematoncefalica causano sonnolenza nei pazienti (Siegel 2004).

Serotonina

Sulla base di studi pionieristici, svolti da Jouvet negli anni '60, il neurotrasmettitore serotonina è stato correlato alla genesi del sonno (Pèrez 2012) . Questo gruppo di neuroni è localizzato nel nucleo del rafe (struttura mediale che si estende dal mesencefalo alla medulla). Così come per la noradrenalina e l'istamina, questi neuroni sono inattivi durante il sonno, in particolare durante la fase REM, e sono importanti nel mantenimento dell'eccitazione, nella regolazione del tono muscolare e di alcune fasi del sonno REM. Infatti, in seguito ad un loro danneggiamento o distruzione l'effetto inibitorio viene a mancare. Durante il sonno REM i neuroni serotoninergici, istaminergici e noradrenergici sono normalmente inattivi ed attivi durante la veglia. Tali fenomeni sono determinati dall'inibizione generata dal GABA, uno fra i maggiori neurotrasmettitori inibitori. Il GABA è in grado di poter controllare separatamente l'attività di questi gruppi neuronali, poiché, in alcune condizioni patologiche quali la catalessi, questi tre

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

gruppi di cellule non cessano contemporaneamente di svolgere la loro attività. Perciò, l'azione del GABA sulle cellule serotoninergiche ed noradrenergiche conduce all'attivazione del sonno REM, dimostrando che l'inattivazione di tali cellule è importante per la regolazione di questo stato (Siegel 2004).

Acetilcolina

Hé Hernández Peòn, negli anni sessanta, fu il primo a proporre un coinvolgimento dell'acetilcolina (ACh) nella genesi del sonno. Egli mostrò come, mediante stimolazione di diverse aree cerebrali con cristalli di ACh, venissero attivate tutte le fasi del sonno (SWS e REM) (Pèrez 2012). Studi successivi, hanno consentito di osservare che il sistema colinergico promuove la comparsa di oscillazioni ad elevata frequenza tipiche della veglia e del sonno REM. I neuroni colinergici coinvolti nel ciclo sonno-veglia sono localizzati nel prosencefalo basale (BF) e nel tegmentum mesopontine (LDT/PPT) del tronco encefalico. Tali neuroni presentano proiezioni corticali a livello del BF caudale che si attivano durante la veglia ed il sonno REM e la loro scarica è correlata ad una attivazione a livello corticale che può, inoltre, essere associati a ritmi theta (Lee, Hassani et al. 2005). Studi farmacologici hanno mostrato come microiniezioni di agonisti colinergici muscarinici quale il carbacolo, un inibitore dell'acetilcolinesterasi, aumenti la durata del sonno REM nella formazione reticolare pontina (Fenik, Rukhadze et al. 2008).

GABA

Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitore variamente distribuito in tutto il SNC. Nei primi anni 70 vennero effettuati studi che lo correlarono al sonno mostrando come infusioni di GABA in ICV determinassero un aumento del SWS e una riduzione del sonno REM. È ormai noto che neuroni GABAergici ipotalamici siano particolarmente attivi durante il SWS e il sonno REM e che questi innervino numerose aree promuoventi la veglia come per esempio il locus coeruleus, il rafe dorsale, il PPT/LDT e l'area perifornicale dell'LH: Attraverso

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

l'inibizione di tutti i sistemi che sono coinvolti nel risveglio e nella veglia il GABA sarebbe in grado di poter promuovere il sonno (Suntsova, Guzman-Marin et al. 2007); a dimostrazione di ciò, nel trattamento dell'insonnia vengono somministrate benzodiazepine che determinano un aumento del segnale GABAergico producendo effetti ipnotici con conseguente riduzione della veglia ed aumento della durata del SWS e un decremento della latenza del SWS (Hirase, Ishida et al. 2008). L'azione promotrice al sonno da parte del GABA venne dimostrata anche da Lacet e collaboratori mediante somministrazione di muscimolo, agonista selettivo del recettore GABA_A, che determinò un incremento di SWS e REM (Lancel, Cronlein et al. 1996).

Ipocretina o Orexina

L'ipocretina nota anche come orexina è un peptide che venne scoperto contemporaneamente da due gruppi di ricerca nel 1998 (Sakurai, Amemiya et al. 1998; Overeem, Scammell et al. 2002; Stoyanova, Rutten et al. 2010). I neuroni deputati alla sua produzione sono localizzati nell'ipotalamo posteriore e dorso-mediante. L'osservazione che la perdita dei suoi neuroni causava narcolessia consentì, per la prima volta, di correlare l'orexina al sonno. Si ha una riduzione di circa il 90% di cellule produttrici ipocretina nei pazienti affetti da catalessia fenomeno che non è stato riscontrato in altre patologie neurodegenerative. Per esempio, l'esame cerebrale *post-mortem* di pazienti con Alzheimer non ha evidenziato la perdita di questa popolazione cellulare mentre quello di pazienti affetti da narcolessia (compresi pazienti giovani) mostrava una elevata perdita di tali neuroni ed, inoltre, bassi livelli di ipocretina nel fluido cerebrospinale (Siegel 2004). La ragione che, nella narcolessia, determina la perdita di tale gruppo di cellule non è stata ancora ben chiarita, l'attacco autoimmune è attualmente la tesi più accreditata. I neuroni orexinergici attivano altri sistemi eccitatori localizzati nell'ipotalamo e nel tronco encefalico, ci sono proiezioni orexinergiche a livello dei neuroni noradrenergici, serotoninergici, colinergici e istaminergici (Ohno and Sakurai 2008).

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Glutammato

I neuroni orexinergici presentano una correlazione inaspettata con l'aminoacido glutammato (Ohno and Sakurai 2008). È stata osservato che, in seguito a somministrazione di orexina a livello dei neuroni motori trigeminali, determina eccitazione ma solo in presenza del glutammato. In altri sistemi, l'orexina ha lo stesso effetto sul rilascio del GABA. Infatti, a livello del locus coeruleus l'ipocretina stimola il rilascio sia del glutammato che del GABA determinando una contemporanea eccitazione ed inibizione che stimola la polarizzazione elettrica delle membrane. La mancata produzione di ipocretina causa instabilità comportamentale e fisiologica, infatti, per esempio la narcolessia è il risultato di una alterazione dei sistemi eccitatori e causa sonnolenza durante il giorno e veglia durante la notte. Al contrario la normale soppressione del sonno REM tende ad essere distrutto nella narcolessia senza soppressione del tono muscolare. Nella narcolessia la perdita dei sistemi di controllo motori ed eccitatori è una funzione della perdita della doppia funzione della ipocretina sulla neurotrasmissione eccitatoria ed inibitoria.

Dopamina

Il neurotrasmettitore dopamina sembrerebbe avere un ruolo nella veglia. Studi svolti sui recettori D2 di topi Knock-out ha consentito di osservare una riduzione della veglia ed un consistente aumento del sonno. I neuroni dopaminergici localizzati in VTA sono particolarmente attivi durante la veglia ed il sonno REM, con aumento del rilascio in specifiche aree come la corteccia prefrontale e il nucleus accumbens (Fonck, Cohen et al. 2005). L'iniezione di 6-idrossidopamina determina una lesione selettiva di questi neuroni con una notevole riduzione della veglia in 24 h. Questi dati confermano un ruolo per questi neuroni nel controllo di veglia (Brown 2012).

Acido Ascorbico

Negli ultimi 40 anni la comunità scientifica ha prestato sempre maggiore attenzione a una molecola, inizialmente nota, per le sue proprietà anti ossidanti: l'Acido Ascorbico (AA). Presente fisiologicamente sotto forma di anione ascorbato, presenta altre caratteristiche, infatti, oltre che come antiossidante si comporta da cofattore enzimatico e da neuromodulatore a livello cerebrale. Nonostante fin ora siano stati attribuiti molteplici ruoli a tale molecola, la sua funzione non è ancora completamente chiara (Rice 2000). Le cellule cerebrali non sono in grado di poter sintetizzare *de novo* l'AA, ma proprio a livello cerebrale tale molecola è presente a concentrazioni più elevate rispetto a tutti gli altri organi (Wilson, Peters et al. 2000). L'assorbimento dell'ascorbato dal sangue al fluido cerebro spinale (CSF) avviene mediante un trasporto stereospecifico e Na^+ dipendente. Nel plesso coroidale è stata osservata la presenza di trasportatori Na^+ -dipendenti, SVCT1 e SVCT2 (Spector and Lorenzo 1973). Nel CSF dei ratti è stato osservato che tale trasporto determina un accumulo di ascorbato pari a 500 μM che è una concentrazione 10 volte più elevata rispetto a quella presente nel sangue di diverse specie di mammiferi (Hornig 1975). L'AA può raggiungere il fluido extracellulare cerebrale (ECF) attraverso un uptake carrier-mediato ed anche mediante semplice diffusione dai capillari alla barriera emato-encefalica (Lam and Daniel 1986). Il deidroascorbato, un prodotto di ossidazione dell'AA, attraverso il trasportatore del glucosio GLUT1 attraversa la barriera ematoencefalica e viene nuovamente ridotto ad ascorbato una volta nel cervello. Questo rappresenta un meccanismo di trasporto alternativo dell'AA a livello cerebrale, confermato anche dalla presenza nel sangue di tale forma ridotta (Agus 1997). L'ascorbato equilibra la sua concentrazione tra CSF e ECF, raggiungendo una concentrazione di 200-400 μM , ed infine dall'ECF passa all'interno delle cellule raggiungendo una concentrazione di circa 10 mM (Wilson 1989) Fig 2.

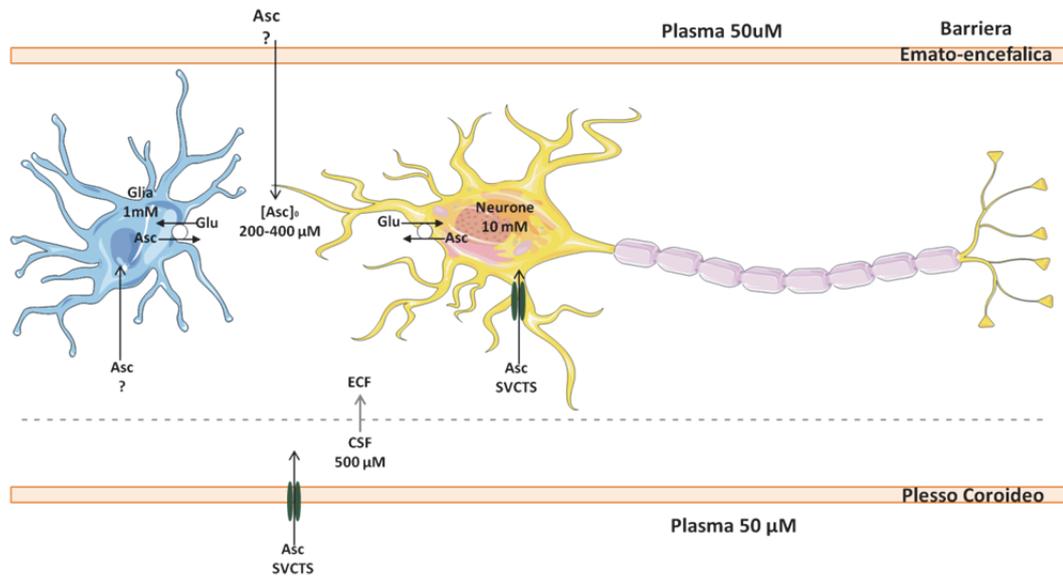


Figura 2. Compartmentalizzazione dell'acido ascorbico a livello neuronale. Glu Glutammato, Asc Ascorbato, ECF Fluido extracellulare cerebrale, CSF fluido cerebrospinale.

La concentrazione dell'ascorbato è tessuto dipendente, infatti, livelli più elevati sono presenti nelle regioni più anteriori (corteccia cerebrale e ippocampo) e progressivamente più bassi nelle regioni posteriori (tronco cerebrale e midollo spinale). Tale andamento corrisponde all'aumento della sostanza bianca nelle regioni posteriori, in cui la concentrazione dell'ascorbato è molto inferiore rispetto alla materia grigia (Rice, Lee et al. 1995). La concentrazione extracellulare di ascorbato $[Asc]_o$ viene regolata in maniera omeostatica. Miele e Fillenz mostrarono la regolazione omeostatica della $[Asc]_o$ in ratti liberi di muoversi. In questo studio, mediante una sonda da dialisi, venne perfusa l'area striatale con una soluzione di 100-1000 μM di ascorbato e, mediante un micro sensore impiantato in una zona adiacente alla sonda, rilevarono la $[Asc]_o$. Essi osservarono che a concentrazioni inferiori a 400 μM i valori $[Asc]_o$ si riducono, al contrario, concentrazioni più elevate determinano un aumento dell'ascorbato extracellulare. L'omeostasi viene dimostrata dal fatto che in seguito a perturbazione la $[Asc]_o$ viene recuperata entro pochi minuti. Nonostante, la $[Asc]_o$ venga regolata omeostaticamente la variazione dei suoi livelli dipende anche da cambiamenti attività quali i ritmi circadiani. Infatti, possiamo osservare come nei

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

ratti (animali notturni) la concentrazione extracellulare di ascorbato durante la notte è il 20-60% più elevata rispetto al giorno (O'Neill, Grunewald et al. 1983). È stato dimostrato che l'aumento della $[Asc]_o$ viene regolato dal suo etero-scambio con il glutammato (Glu). Questo neurotrasmettitore eccitatorio viene rilasciato nello spazio sinaptico, dove è presente in una concentrazione media di 1-5 mM (O'Neill, Grunewald et al. 1983; Clements 1996), a questo punto attraverso il cotrasportatore Na^+ -Glu EAT1/GLAST e EEAT2/GLT-1 viene internalizzato negli astrociti con il contemporaneo rilascio di ascorbato intracellulare. Un'ulteriore conferma proviene dall'osservazione che una microiniezione di Glu nel cervello determina un aumento della concentrazione extracellulare di AA (Alessandri, Landolt et al. 1996). La regolazione omeostatica $[Asc]_o$, modulata dal rilascio del Glu, indica che lo spazio extracellulare è un compartimento importante per la neuroprotezione dell'ascorbato. Abbiamo a disposizione sempre nuovi strumenti che ci permettono di capire i meccanismi attraverso i quali i livelli di ascorbato cerebrale variano, è necessario comprendere la sua funzione cerebrale (Rice 2000).

Scopo della ricerca

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

La funzione del sonno non è ancora completamente nota ed è attualmente di grande interesse per la comunità scientifica. Lo scopo di tale ricerca è stato quello di studiare la neurochimica corticale durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante sperimentazione *in vivo* avvalendosi della microdialisi e di neurosensori amperometrici strutturati. Attraverso questi ultimi è stato possibile poter studiare in tempo reale la variazione dei livelli di acido ascorbico nei diversi stati veglia, sonno REM e NREM. Il campionamento mediante la tecnica di microdialisi e l'analisi attraverso la tecnica HPLC/ORBITRAP ha consentito di poter identificare centinaia di molecole facenti parte di diverse vie metaboliche coinvolte nella regolazione del ciclo sonno veglia.

Materiali e Metodi

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Costruzione e calibrazione del microsensore per l'Acido Ascorbico

L'elettrodo di lavoro (WE) è stato realizzato utilizzando un filo di rame rivestito in Teflon di cui circa 0,5 mm sono stati rimossi ottenendo, in questo modo, l'esposizione del rame. Quest'ultimo è stato inserito all'interno di un capillare di silicio (ID 75 μm e OD 150 μm) riempito, all'altra estremità, con una pasta di carbonanotubi (MWCNTs area di superficie: 250-300 m^2/g ; diametro: 9,5 μm ; lunghezza: 1,5 μm) e colla epossidica in un rapporto 1:20 e lasciati a 70 °C overnight. Fig3.

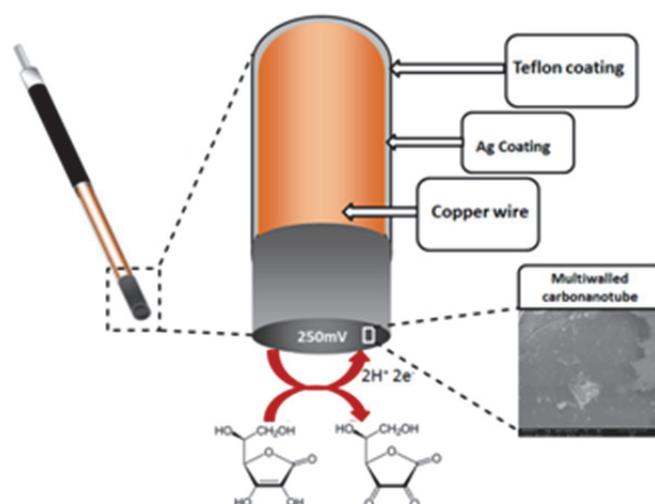


Figura 3. Rappresentazione schematica del microsensore in MWCNTs, la reazione di ossidazione dell'acido ascorbico in deidroascorbato avviene sulla superficie dell'elettrodo. Inoltre è mostrato il particolare della superficie attiva ottenuta al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM).

Il potenziale di ossidazione dell'Acido Ascorbico è stato stabilito sperimentalmente a +250 mV (vs Ag/AgCl) mediante voltammetria ciclica (100mV/s). I microsensori per l'Acido Ascorbico sono stati calibrati, mediante Amperometria a Potenziale Costante, in condizioni di quiescenza aggiungendo volumi noti (250, 500, 750, 1000 μM) di una soluzione standard di AA ad una di PBS. L'elettrodo ausiliario contatore (AUX-CE) è stato realizzato utilizzando un filo d'argento (con il diametro di 0.25 mm) lungo 1,5 cm privo del suo rivestimento in Teflon. L'elettrodo di riferimento (REF) Ag/AgCl è costituito da

un filo d'argento rivestito di Teflon di cui sono stati esposti solo 0,5 mm. Esso è stato immerso in una soluzione di AgCl satura e per 1 min è stato applicato un potenziale di 9V. Gli elettrodi AUX, REF e WE successivamente alla calibrazione *in vitro* sono stati impiantati *in vivo*.

Preparazione pasta in carbonanotubi

Il carbonio è presente in tutte le forme di vita e sono alla base della chimica organica ed è in grado di legarsi con sé stesso dando origine a diverse forme allotropiche tra cui i carbonanotubi. Essi presentano una struttura cilindrica con dimensioni nell'ordine dei nanometri e sono costruiti con un rapporto diametro/lunghezza pari a 132.000.000:1 superiore a qualsiasi altro materiale. Grazie alle loro proprietà chimiche e fisiche si prestano all'utilizzo in diversi campi. I carbonanotubi sono particolarmente resistenti alla trazione e mediante diversi tipi di funzionalizzazione sono stati impiegati in campo biomedico come carriers di farmaci e potenziali agenti contro il tumore. Sono conduttori termici e possiedono ottime capacità conduttive che però variano a seconda della loro geometria. Tutte queste caratteristiche li rendono utilizzabili come trasduttori di segnali elettrochimici. Il loro impiego nel campo delle neuroscienze e la loro biocompatibilità sono ormai ampiamente noti. Per la realizzazione dei microsensori sono stati impiegati *multiwalled carbonanotubes* (MWCNTs area di superficie : 250-300 m²/g ; diametro: 9,5 μm; lunghezza: 1,5 μm).

È risaputo che i carbonanotubi sono insolubili e formano agglomerati in diversi solventi e matrici polimeriche a causa delle numerose interazioni di van der Waals tra queste strutture. Per rendere compatibili i carbonanotubi con gli elementi utilizzati per la costruzione dei nanosensori, questi, sono stati solubilizzati in acqua. Tuttavia, la solubilizzazione dei MWCNTs in matrice acquosa, contenente il 10 % di etanolo, è risultata inefficace poiché questi ultimi precipitavano. Tale procedura ha richiesto la loro derivatizzazione modificando il metodo di Heli e collaboratori. Nella prima tipologia 50 mg di MWCNTs sono stati dispersi in una soluzione di HNO₃ 6 M e sonicati per 2 min così da favorirne la dispersione nel solvente. La soluzione è stata lasciata a temperatura ambiente per 12 h così da

allontanare i residui dei processi catalitici necessari per produrre i MWCNTs. Successivamente, sono stati lavati in acqua bidistillata e lasciati asciugare a temperatura ambiente. I MWCNTs così trattati sono stati sottoposti a reflusso per 6h in una soluzione 3:1 di acido solforico e acido nitrico; successivamente, mediante numerose centrifugazioni sono stati lavati con acqua bi-distillata fino a neutralizzazione. Tali processi di derivatizzazione sono stati utili per incrementare l'idrofobicità dei MWCNTs funzionalizzando la loro superficie con gruppi polari (-OH e -COOH). Al termine della derivatizzazione, per favorirne la disidratazione, la polvere è stata lasciata per 48 h a 40 °C. La solubilizzazione della polvere ottenuta ha consentito di ottenere una soluzione stabile per 3 h. Nella seconda tipologia MWCNTs funzionalizzati sono stati disciolti in una soluzione acquosa al 5% PEI. Quest'ultima è una resina policationica che, mediante forze intermolecolari, interagisce con i MWCNTs determinando un notevole incremento della superficie attiva senza, allo stesso tempo, alterarne le proprietà elettrocatalitiche (Mamedov, Kotov et al. 2002; Rivas, Rubianes et al. 2007; Xueping, Jie et al. 2015) I MWCNTs derivatizzati possiedono cariche negative superficiali, l'interazione di questi ultimi con la PEI consente di ottenere una separazione dei singoli MWCNTs impedendo una ulteriore aggregazione e precipitazione attraverso repulsioni elettrostatiche. La stabilità di tale soluzione è stata osservata per oltre sei mesi Fig 4

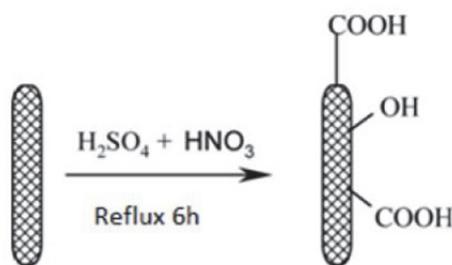


Figura 4. Rappresentazione schematica della derivatizzazione dei MWCNTs attraverso dispersione in HNO₃ 6M, reflusso in H₂SO₄ e HNO₃ (3:1) mediante reflusso e successivo lavaggio in acqua bidistillata per neutralizzazione

Una terza preparazione prevedeva la solubilizzazione dei MWCNTs in Tetraidrofurano (THF) in proporzione 1:10 seguita da una sonicazione di 5 min al termine dei quali la soluzione veniva portata ad un rapporto di 1:20, 1:70, 1:75 tutte seguite da una sonicazione di 5 min. La soluzione ottenuta veniva lasciata per 24 h a temperatura ambiente e sottoposta a sonicazione per 1 min. attraverso tale procedura è stato possibile poter ottenere una soluzione densa .

Costruzione della sonda microdialitica

La cannula guida corticale, la dummy cannula e la sonda da microdialisi sono state tutte progettate e create nel nostro laboratorio. La cannula corticale è stata realizzata utilizzando un micro-puntale da 10 µl tagliandolo così che avesse una lunghezza di 13 mm dalla punta. La dummy cannula è stata creata inserendo all'interno di un micro puntale da 10 µl, lungo 16 mm, un tubo di acciaio di piccolo diametro (Cadence Technology Inc.) e fissato con colla epossidica. La sonda da microdialisi è stata realizzata utilizzando:

- una porzione lunga 16 mm di un micro puntale da 10 µl,
- due porzioni (lunghezza 3 cm) di un tubo di polietilene dal diametro (CMA Microdialysis), che fungono rispettivamente da inlet ed outlet,
- una sezione di un capillare siliceo rivestito di materiale plastico (ID 75 µm / OD 150 µm, Scientific glass engineering, Milton Keynes, UK),
- una fibra da dialisi semi-permeabile in poliacrilonitrile, con cut-off dal peso molecolare di 12 kDa (AN69, Gambro- Hospal Industry, France).

Il capillare di silicio è stato inserito all'interno di un tubo di polietilene, costituendo l'inlet. Quest'ultimo e la seconda porzione di polietilene, che funge da outlet, sono stati inseriti e fissati all'interno del micro puntale da 10 µl. A questo punto il capillare di silicio è stato inserito all'interno di una fibra da dialisi la cui estremità è stata sigillata con cemento dentale e tagliata a becco di clarino. La superficie attiva della sonda è di 1,5 mm e il suo diametro finale di 0,3 mm. Fig 5

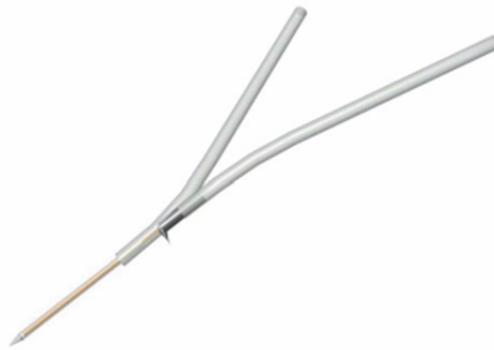


Figura 5. Rappresentazione tridimensionale della sonda da microdialisi a geometria coassiale utilizzata nel presente studio.

Animali

In tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi maschi C57-BL6, di circa 90 giorni e con peso corporeo di circa 25-30 g. Gli animali sono stati mantenuti in condizioni standard con un ciclo luce/buio di 12 ore (accensione della luce alle ore 8:00) e accesso a cibo e acqua *ad libitum*.

Chirurgia stereotassica

La chirurgia è stata effettuata mediante anestesia inalatoria profonda con isoflurano (1-1,5%), un gas alogenato, posizionando l'animale sul tavolo stereotassico ed assicurandolo mediante una barra dentale e due barre auricolari. A ciascun topo sono stati somministrati, mediante iniezione intraperitoneale ip, 0.15 ml di soluzione salina e l'antibiotico cefazolin (15-20 mg/Kg) attraverso iniezione intramuscolare im; inoltre, al fine di mantenere la superficie oculare sempre umida è stata applicata una crema oftalmica. Nei topi sono stati impiantati due microsensori per l'Acido Ascorbico o due sonde da microdialisi, a livello della corteccia prefrontale mediale (mPFC) destra e della corteccia motoria (M1) sinistra in accordo con le coordinate stereotassiche fornite dall'atlante Franklin&Paxino. mPFC: AP +1.94, ML -0.3 dal bregma, M1: AP +1.5, ML: +2 dal bregma. Per le registrazioni elettroencefalografiche sono stati impiantati tre

elettrodi a vite: due nella corteccia parietale con coordinate AP -2 e ML \pm 2 (dal bregma) ed uno a livello cerebellare che si comporta da elettrodo di riferimento. Due elettrodi di acciaio sono stati collocati nei muscoli del collo per le registrazioni elettromiografiche EMG. Tutti gli elettrodi sono stati mantenuti immersi in una soluzione di alcool etilico al 100% e, prima dell'impianto, lavati con acqua distillata. Gli elettrodi e le sonde sono state fissate al cranio utilizzando il cemento dentale (Flow-It ALC Flowable Composite, PENTRON). Durante l'anestesia la temperatura corporea dell'animale è stata mantenuta costante a 36°C mediante l'impiego di una tappetino isotermico e monitorata mediante l'utilizzo di un termometro rettale. Al termine di ogni chirurgia, mediante iniezione sottocutanea, veniva somministrato l'antidolorifico meloxicam (1-2 mg/kg). I topi, alloggiati in gabbie trasparenti di plexiglas, venivano monitorati fino al loro risveglio post-operatorio. Infine, i topi venivano collocati nella loro stanza con luce e temperatura costante ed accesso a cibo e acqua *ad libitum*. Ogni esperimento è stato effettuato una settimana dopo la chirurgia consentendo una totale ripresa fisica e comportamentale dell'animale. Fig 6

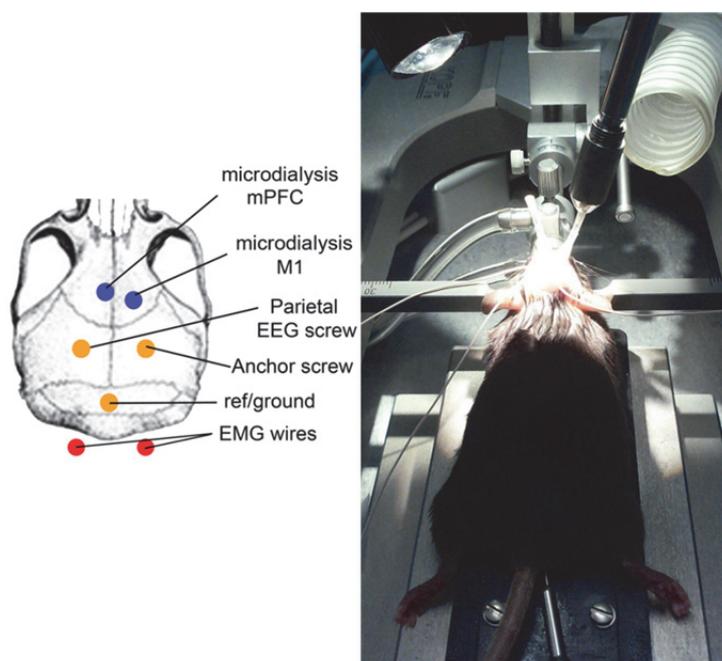


Figura 6. Immagine di un topo su tavolo stereotassico al termine della chirurgia e rappresentazione schematica delle sedi di impianto delle sonde e degli elettrodi.

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Monitoraggio dell'acido ascorbico in tempo reale

Un gruppo di topi (n=3) è stato utilizzato per poter studiare le variazioni di concentrazione nelle diverse condizioni sonno veglia. Una settimana dopo la chirurgia, quando il ritmo-sonno veglia è tornato ai normali standard, alle ore 8:00 am è stata avviata la registrazione EEG ed EMG. Allo stesso tempo, mediante amperometria a potenziale costante applicando un potenziale di 250 mV è stata registrata l'ossidazione dell'acido ascorbico a deidroascorbato mediante il neurosensore in MWCNTs. Durante tutto l'esperimento (durata 24 ore) il topo era alloggiato nella sua gabbietta con accesso a cibo e acqua *ad libitum* e con nessuna interferenza proveniente dall'operatore o dall'ambiente circostante. Fig 7

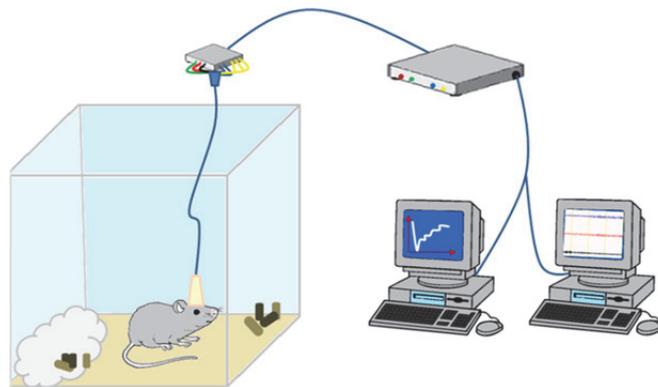


Figura 7. Rappresentazione 3D del modello sperimentale impiegato. Il topo alloggiato nella gabbietta connesso al sistema di registrazione amperometrico ed EEG/EMG che consentono la registrazione in tempo reale del segnale.

Microdialisi

Gli esperimenti sono stati effettuati sette giorni dopo la chirurgia. Il giorno precedente all'esperimento, il topo è stato anestetizzato brevemente con l'isoflurano (0.5% volume) e le due dummy cannula e sono state rimosse e sostituite con le sonde da microdialisi, la cui funzionalità è stata testata precedentemente. Entrambe le sonde sono state collegate ad un circuito microfluidico e perfuso con un fluido extracellulare artificiale (aECF, composto da: NaCl 147 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ 1.2 mM, MgCl₂ 0.85 mM) attraverso

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

l'impiego di una pompa da microinfusione con un flusso di 1.1 $\mu\text{l}/\text{min}$. In seguito alla verifica del corretto funzionamento delle sonde, dopo il loro inserimento, il flusso è stato interrotto fino al giorno seguente. Al fine di prevenire ogni interferenza sul comportamento del topo durante il prelievo dei campioni, inlet e outlet sono stati connessi con un tubo in polietilene di piccolo diametro. Lo spazio morto del prolungamento dell'outlet è stato calcolato così da valutare il ritardo tra il campionamento con la microdialisi e l'EEG (15 min) e mediante una successiva analisi i dati sono stati sincronizzati. Durante le 11 ore di esperimento (dalle ore 7:00 am alle 6 pm) i campioni sono stati raccolti all'interno di provette da 250 μl ogni 15 minuti. Per ciascuna sonda sono stati raccolti 42 campioni e posti a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino alla loro analisi High Performance Liquid Chromatography (HPLC)/Orbitrap analysis.

Esperimento di microdialisi

L'esperimento è stato effettuato 7 giorni dopo la chirurgia quando il ciclo sonno-veglia si è ristabilizzato. Sono state progettate due tipologie di esperimento : Sonno e Privazione di sonno .

Esperimento 1 (Sonno). Un gruppo di (n=7) topi sono stati utilizzati per studiare la neurochimica corticale del cervello. Il giorno dell'esperimento alle ore 7:00 am (un'ora prima che la luce si accendesse) il topo è stato posto su un tapis roulant che si muoveva ad una velocità di $\sim 0.7\text{ cm}/\text{sec}$ ed allo stesso tempo veniva attivato il flusso per la microdialisi (rate 1.1 $\mu\text{l}/\text{min}$). Per due ore il topo è stato mantenuto forzatamente sveglio mediante una lenta locomozione sul tapis roulant. La prima ora era necessaria per la stabilizzazione della microdialisi, mentre la seconda ora veniva utilizzata come baseline. Per le successive sei ore (dalle 9:00 am alle 3:00 pm) il topo veniva alloggiato nuovamente nella sua gabbietta e lasciato dormire (*sleep opportunity period*). Alle 3:00 pm, per le successive tre ore, veniva ricollocato sul tapis roulant ottenendo, così, un periodo di veglia forzata successivo a quello in cui aveva avuto la possibilità di dormire.

Esperimento 2 (Sleep Deprivation). Un nuovo gruppo di topi (n=7) è stato utilizzato per svolgere questa tipologia di esperimento. Così come descritto per l'esperimento precedente, alle ore 7:00 am è stato attivato il flusso della microdialisi (rate 1.1 $\mu\text{l}/\text{min}$). ed il topo posto sul tapis roulant che lo costringe ad un movimento continuo e lento (velocità ~ 0.7 cm/sec). Dalle 7:00 alle 9:00 am il topo veniva mantenuto sveglio attraverso questa metodica, la prima ora era necessaria per la stabilizzazione della microdialisi, mentre, la seconda per la baseline. Dalle 9:00 am alle 3:00 pm il topo è stato alloggiato nella gabbietta e mantenuto sveglio mediante l'esposizione a nuovi oggetti (sleep deprivation period). In questa parte dell'esperimento gli oggetti venivano forniti solo quando il topo si accingeva ad addormentarsi cercando di ridurre il più possibile l'interferenza da parte dell'operatore.

In tutti gli esperimenti di microdialisi veniva effettuata la registrazione del segnale EEG ed EMG proveniente dagli elettrodi impiantati. Fig 8

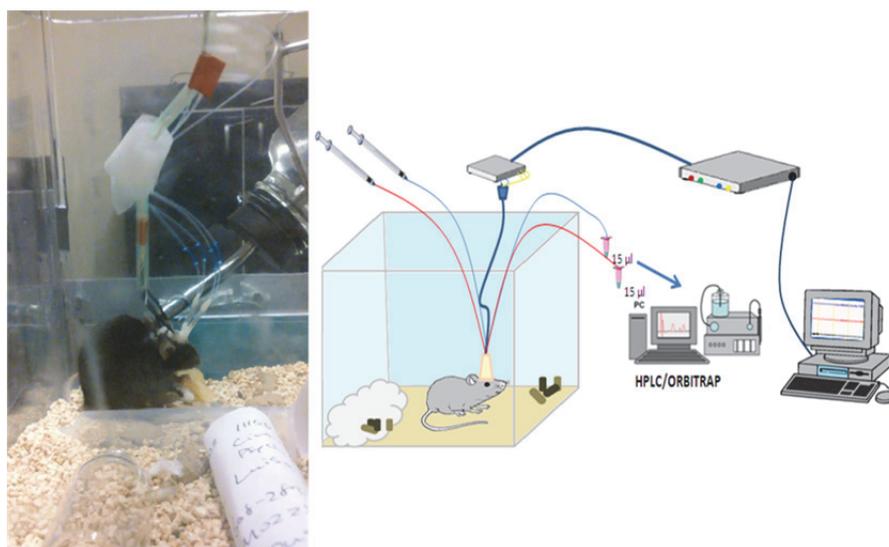


Figura 8. Immagine di un topo all'interno della gabbietta durante la Sleep Deprivation e rappresentazione schematica del modello sperimentale in cui viene mostrato il topo all'interno della gabbietta durante la microdialisi e la contemporanea registrazione del tracciato EEG ed EMG. I campioni di microdializzato vengono successivamente analizzati mediante la metodica HPLC/ORBITRAP.

Analisi dei campioni mediante la tecnica HPLC/ORBITRAP

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che consente di poter misurare la massa delle molecole e degli atomi. Tre parti compongono principalmente lo spettrometro di massa :

- la sorgente ionica
- l'analizzatore di massa
- il detector ionico

Nella prima fase le molecole vengono ionizzate dalla sorgente ionica, successivamente l'analizzatore di massa separa gli ioni ottenuti in relazione al loro rapporto massa/carica. Gli ioni frammentati colpiscono il detector che misura l'intensità di corrente relativa a ciascun ione. Questo particolare analizzatore è costituito a monte da un filtro quadrupolare C-Trap che accumula gli ioni riducendo le collisioni tra gli ioni. A valle del C-trap è localizzato l'ORBITRAP che riceve gli ioni provenienti dal C-trap e può essere considerato una trappola ionica quadrupolare. La combinazione tra il filtro di massa e l'analizzatore ORBITRAP consente di poter avere una analisi nell'ordine delle picomoli, inoltre, permette di misurare la massa di uno ione e dei suoi isotopi con una accuratezza tale da permettere di determinarne la composizione elementare.

Istologia

Al termine dell'esperimento gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano e sacrificati mediante perfusione intracardiaca con paraformaldeide al 4%. Il cervello, così fissato, è stato prelevato e sezioni dello spessore di 50 µm sono state ottenute mediante un vibro-microtomo. Il corretto impianto delle sonde è stato confermato mediante l'analisi istologica delle sezioni ottenute.

Analisi statistica

Lo spettro EEG è stato analizzato mediante Fast Fourier Transform suddividendo il file in epoche di 4 secondi e una risoluzione di 25 Hz. Il segnale è stato caricato

sul programma Matlab come standard TDT e successivamente convertito in EDF. La veglia, il sonno NREM e REM sono stati identificati manualmente (SleepSign, Kissei COMTEC) in epoche di 4 secondi con criteri standard. Le epoche contenenti gli artefatti, presenti principalmente durante la veglia, sono state escluse dall'analisi dello spettro. La variazione della concentrazione delle diverse molecole analizzata è stata considerata sotto forma di valori assoluti e tutti i dati vengono presentati come $\text{media} \pm \text{errore standard della media}$.

Risultati

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Caratterizzazione dei micro sensori per l'acido ascorbico

I sensori per l'Acido Ascorbico sono stati testati *in vitro* utilizzando un beaker di Teflon da 10 ml con un potenziale applicato di +250 mV. Il sistema di calibrazione è stato posizionato su un agitatore magnetico necessario per miscelare la soluzione dopo ogni iniezione. I microsensori sono stati calibrati come descritto nella sezione di Materiali e Metodi ottenendo differenti sensibilità. La retta di regressione, mostrata in figura 9, ottenuta dalla calibrazione del micro sensore epoxy-grafite mostra una sensibilità pari a $0,76 \pm 0,11 \text{ nA} \times \mu\text{M}^{-1}$ con un R^2 corrispondente a 0,989. Fig 9

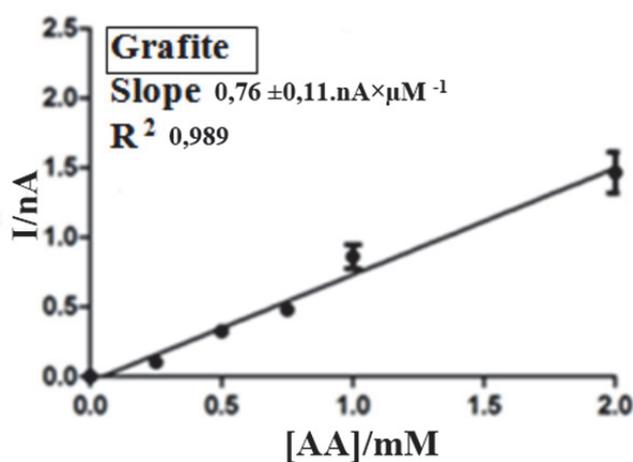


Figura 9. Retta di regressione del micro sensore epoxy-grafite.

L'aggiunta alla miscela di grafite-epoxy del 18% di MWCNTs ha consentito di ottenere una sensibilità pari a $0,257 \pm 0,06 \text{ nA} \times \mu\text{M}^{-1}$, con un R^2 corrispondente a 0,998, di 3 volte inferiore rispetto a quella ottenuta mediante il micro sensore epoxy-grafite. Fig 10

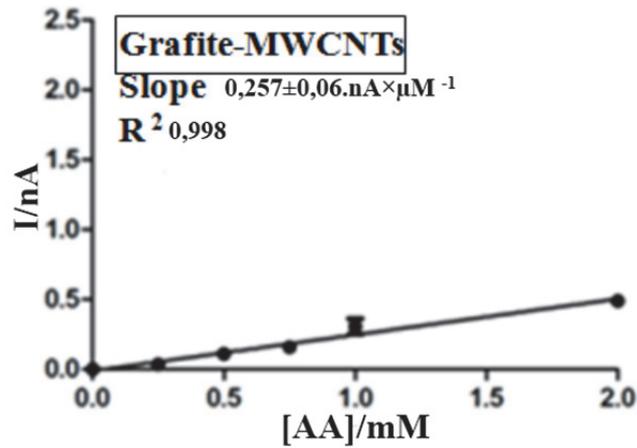


Figura 10. Regressione lineare del microsensore Grafito-MWCNTs

Un terzo disegno era costituito da un microsensore in grafite sulla cui superficie era stata aggiunta la miscela di MWNTs derivatizzati. Questo disegno ha consentito di poter ottenere una sensibilità all'AA superiore a quella degli altri due disegni descritti precedentemente ($3,53 \pm 0,19 \text{ nA} \times \mu\text{M}^{-1}$ con un $R^2 0,997$). In figura 11 viene mostrata la retta di regressione del microsensore, la sua sensibilità è aumentata di circa 5 volte rispetto al dispositivo in grafite.

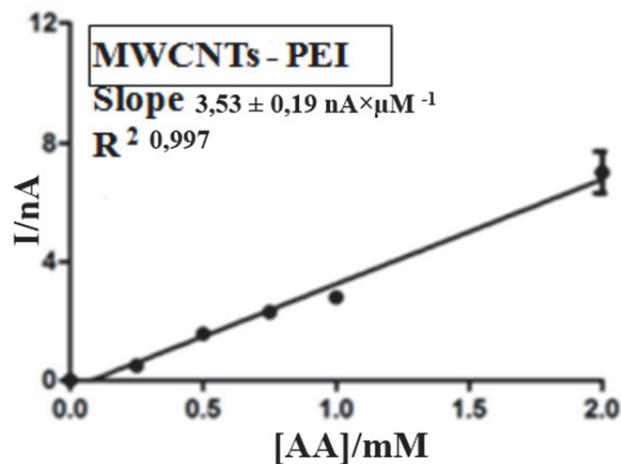


Figura 11. Regressione lineare del microsensore MWCNTs-PEI.

Il quarto dispositivo era stato progettato utilizzando una nuova miscela di MWCNTs solubilizzati mediante il solvente tetraidrofurano (THF). La calibrazione con AA ha mostrato importanti risultati con uno slope di $6,05 \text{ nA} \times \mu\text{M}^{-1}$ con un $R^2 0,999$ e dunque una sensibilità di 8 volte superiore rispetto al dispositivo in grafite fig 12.

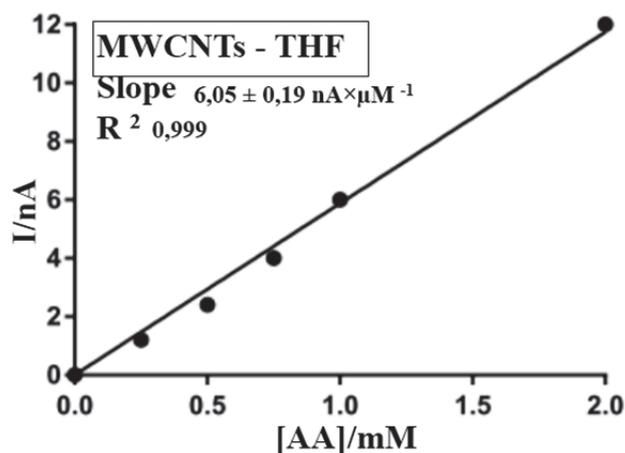


Figura 12. Regressione lineare del microsensore in MWCNTs-THF.

Monitoraggio real-time dell'acido ascorbico nella corteccia prefrontale mediale di topi freely moving

Per gli esperimenti *in vivo* è stato scelto il quarto disegno di microsensore poiché, in seguito alla sua caratterizzazione *in vitro*, è quello che aveva mostrato maggiore sensibilità all'acido ascorbico. Le variazioni di concentrazione dell'acido ascorbico, registrate mediante il neurosensore, ed il tracciato EEG ed EMG sono stati elaborati ed, infine, i dati incrociati. I risultati sono mostrati in figura 13 in cui è rappresentata la variazione dei livelli di acido ascorbico extracellulare nel tempo e in relazione ai vari stati: veglia, sonno NREM e REM. Possiamo osservare una riduzione dei livelli di acido ascorbico durante la veglia ed il sonno REM ed un suo notevole incremento durante la fase NREM. L'andamento dell'acido ascorbico è esattamente inverso a quello del glutammato. Dash e collaboratori nel 2009, mediante l'impiego di biosensori per il glutammato,

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

monitorarono le fluttuazioni di tale neurotrasmettitore durante il normale ciclo sonno veglia ma anche durante esperimenti di *sleep deprivation* osservando un suo incremento durante la veglia ed il sonno REM (Dash, Douglas et al. 2009). I risultati, da noi ottenuti, riguardanti l'AA e quelli del glutammato riportati in letteratura sono in accordo con l'ipotesi dello eteroscambio glutammato-ascorbato. Fillenz e collaboratori dimostrarono che il rilascio dell'acido ascorbico intracellulare avviene in seguito alla ricaptazione del glutammato all'interno delle cellule mediante un meccanismo Na^+ dipendente (Grunewald and Fillenz 1984). L'etero scambio glutammato-ascorbato riduce gli effetti citotossici indotti dal glutammato. In particolare, la funzione dell'ascorbato sembrerebbe essere quella di impedire lo squilibrio ossido-riduttivo causato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte in seguito all'attivazione dei recettori glutamatergici. I recettori kainato ed NMDA, infatti, possono causare depolarizzazione dei mitocondri con conseguente produzione di perossido (Rice 2000). In base a tutte queste evidenze possiamo ipotizzare che l'acido ascorbico, fungendo da antiossidante e quindi svolgendo la sua azione sui radicali liberi prodotti durante la veglia partecipi alla funzione ristorativa del sonno.

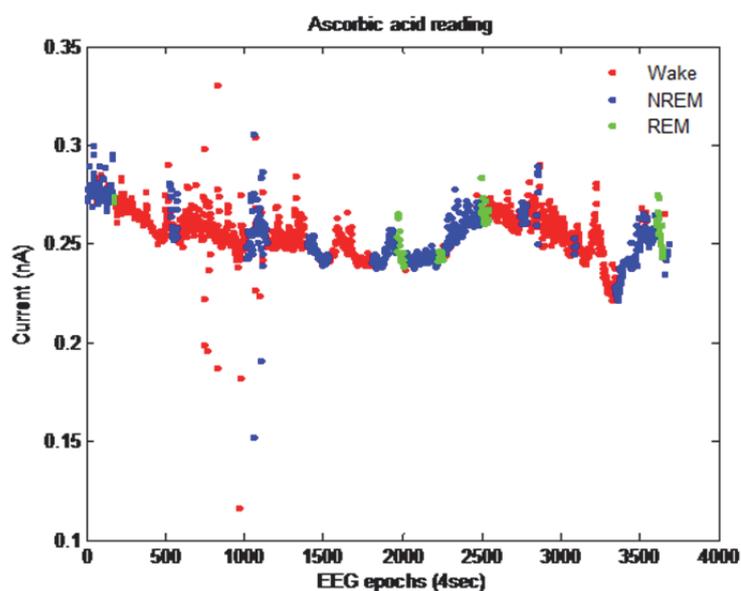


Figura 13. Variazione dei livelli di Acido Ascorbico nel tempo ed in relazione ai tre stati Veglia, sonno NREM e REM.

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Analisi metabolomica del fluido extracellulare di mPFC e M1

In seguito agli esperimenti di *sleep* e *sleep deprivation* i campioni di microdialisi prelevati ogni 15 min, provenienti dal liquido extracellulare di mPFC e M1, sono stati analizzati mediante la tecnica HPLC/ORBITRAP. Tale tecnica ci ha consentito di poter identificare centinaia di metaboliti che fanno parte di diverse vie metaboliche quali il metabolismo del piruvato, la glicolisi ma anche neurotrasmettitori e i loro derivati metabolici. Qui di seguito vengono descritti i risultati preliminari riguardanti alcune molecole che mostrano una variazione dei loro livelli in relazione alle differenti condizioni sperimentali.

Piruvato

Il piruvato, molecola fondamentale per il metabolismo energetico eucariotico ed umano, è il prodotto finale della glicolisi. Esso viene veicolato all'interno dei mitocondri per essere utilizzato come combustibile principale nel ciclo dell'acido citrico. Nei mitocondri, il piruvato consente la produzione di ATP mediante fosforilazione ossidativa e molteplici vie biosintetiche che intersecano il ciclo dell'acido citrico. Il metabolismo mitocondriale del piruvato è regolato da numerosi enzimi tra cui il carrier mitocondriale del piruvato, la piruvato deidrogenasi e la piruvato carbossilasi che consentono di modulare il carbonio globale mediante il flusso del piruvato (Gray, Tompkins et al. 2014). In figura 14 A viene mostrata la variazione dei livelli di piruvato durante l'esperimento di *Sleep opportunity*. Rispetto alla baseline, nella regione mPFC, possiamo osservare un aumento non significativo del piruvato del 31% durante il sonno ed un significativo incremento del 121.17% durante la veglia. Inoltre, il piruvato mostra un incremento del 89,37% ($p < 0,05$) durante la veglia rispetto al precedente periodo di *sleep opportunity* nella regione mPFC, mentre, nella regione M1 non si osservano variazioni significative. Le variazioni del piruvato in mPFC sono conformi agli esperimenti svolti da Reich e collaboratori negli anni '70. Essi studiarono la variazione dei livelli di alcune molecole, tra cui il piruvato, durante

il sonno e la veglia osservando una riduzione dei suoi livelli durante il sonno (Reich, Geyer et al. 1972). Nell'esperimento di *sleep deprivation* possiamo osservare che durante il periodo di privazione di sonno si ha un aumento in mPFC ed in M1 rispettivamente del 21% e del 32,5% ($p < 0,05$) ed un decremento del piruvato, in entrambe le regioni di interesse, del 33,25% e del 35,6% (Fig 14 B). Viene mostrato, dunque, un aumento della concentrazione extracellulare di piruvato durante la privazione di sonno. I nostri dati sono in linea con le precedenti misurazioni dei livelli di piruvato durante esperimenti di *sleep deprivation* svolti su ratti (Kalinchuk, Urrila et al. 2003). Secondo la teoria classica il glucosio è la principale fonte di energia cerebrale. L'attivazione degli enzimi fosfofruttochinasi ed eterochinasi viene indotta da una riduzione dei livelli di ATP/AMP, determinando un aumento della glicolisi e conseguentemente aumento del piruvato che entra nel ciclo dell'acido citrico (Fox 2003). Da tale teoria possiamo dedurre che la riduzione dei livelli di piruvato durante il sonno ed il suo aumento durante la *sleep deprivation* dipendano da un aumento del metabolismo energetico.

Tirosina

La tirosina è un aminoacido abbondante nella dieta proteica ed è considerato il punto d'inizio nella sintesi dei neurotrasmettitori dopamina e noradrenalina. All'interno dei neuroni dopaminergici la tirosina viene convertita in diidrossifenilalanina (L-DOPA) dall'enzima citosolico tirosina idrossilasi (TH). In seguito, avviene la decarbossilazione dell'L-DOPA a dopamina ad opera dell'enzima DOPA decarbossilasi (John 1997), infine la dopamina- β -decarbossilasi conduce alla sintesi della noradrenalina (Goldstein 1995). In figura 14 A e B sono presenti i grafici che mostrano la variazione dei livelli di tirosina in entrambe le tipologie sperimentali. Essa non presenta nessuna significativa variazione durante gli esperimenti di *sleep* che, invece, possiamo osservare negli esperimenti di *sleep deprivation*. In entrambe le regioni di interesse, rispetto alla baseline, si osserva una significativa riduzione della tirosina durante il periodo di sonno pari al 39% in entrambe le regioni. Come detto precedentemente, la tirosina

è l'amminoacido precursore nella biosintesi della dopamina e della noradrenalina. Il neurotrasmettitore dopamina sembrerebbe avere un ruolo nella veglia. Studi svolti da Fonck e collaboratori sui recettori D2 di topi Know-out hanno consentito di osservare una riduzione della veglia ed un consistente aumento del sonno. I neuroni dopaminergici localizzati in VTA sono particolarmente attivi durante la veglia ed il sonno REM, con aumento del rilascio di dopamina in specifiche aree come la corteccia prefrontale e il *nucleus accumbens* (Fonck 2005). La variazione dei livelli di noradrenalina in due differenti regioni corticali è stata valutata mediante esperimenti di microdialisi *in vivo* durante il normale ciclo sonno veglia e in esperimenti di *sleep deprivation*. Da tali dati sperimentali, possiamo osservare un aumento di questo neurotrasmettitore durante la veglia (incremento più evidente durante il periodo di *sleep deprivation*) ed un suo decremento durante il sonno (Bellesi, Tononi et al. 2015). In relazione a quanto noto dalla letteratura possiamo osservare come l'andamento della tirosina negli esperimenti di *sleep deprivation* sia concorde con il comportamento e la funzione della dopamina e noradrenalina durante la veglia. Infatti, nella finestra temporale in cui il topo è stato costretto a rimanere sveglio osserviamo un aumento dei livelli di tirosina necessari alla produzione di una maggiore quantità di dopamina e noradrenalina. Alla luce di tali evidenze possiamo ricondurre un coinvolgimento della tirosina nella regolazione dello stato di veglia.

Acido omovanillico (HVA)

L'acido omovanillico (HVA) noto anche come acido 3-metossi-4-idrossifenil acetico è un metabolita appartenente al metabolismo delle catecolammine. Negli esperimenti di microdialisi (fig. 14) l'HVA ha mostrato variazioni significative in entrambe le tipologie sperimentali. In particolare durante l'esperimento di *sleep*, in ambedue le regioni di interesse, ha mostrato una riduzione di circa il 30% ($p < 0,05$) ma non durante il periodo di veglia obbligatoria. Inoltre, possiamo osservare un significativo incremento dell'HVA, durante la veglia rispetto al periodo di *sleep opportunity*, pari rispettivamente al 17% e al 12%. In figura 14 B viene mostrato il grafico che mostra la variazione dello acido omovanillico

durante il periodo di *sleep deprivation*. Rispetto alla baseline, osserviamo una significativa riduzione di circa il 50% durante la *sleep deprivation* e del 65% durante il sonno, in entrambe le regioni di interesse. L'HVA, esclusivamente nella regione mPFC, presenta una significativa riduzione del 16% durante il sonno rispetto alla *sleep deprivation*. L'HVA è il prodotto finale del catabolismo della dopamina. Una volta rilasciata nello spazio sinaptico, essa, viene ricaptata all'interno della terminazione nervosa e metabolizzata ad acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC) ad opera degli enzimi monoamminossidasi (MAO). Circa il 20 % della dopamina rilasciata rimane nello spazio sinaptico e viene metabolizzata a 3-metossitiramina (3-MT) ad opera dell'enzima catecol-O-metil-transferasi (COMT). La 3-MT e il DOPAC, a questo punto, ad opera rispettivamente dagli enzimi MAO e COMT, vengono rapidamente convertiti in HVA, il metabolita finale della dopamina (Amin, Davidson et al. 1992). Basandoci sull'assunto che la produzione di metaboliti da parte dei neuroni riflette il rilascio dei neurotrasmettitori, il metabolismo e dunque la loro attività possiamo proporre l'acido omovanillico come parametro indiretto nella valutazione della veglia essendo esso il prodotto finale del catabolismo della dopamina.

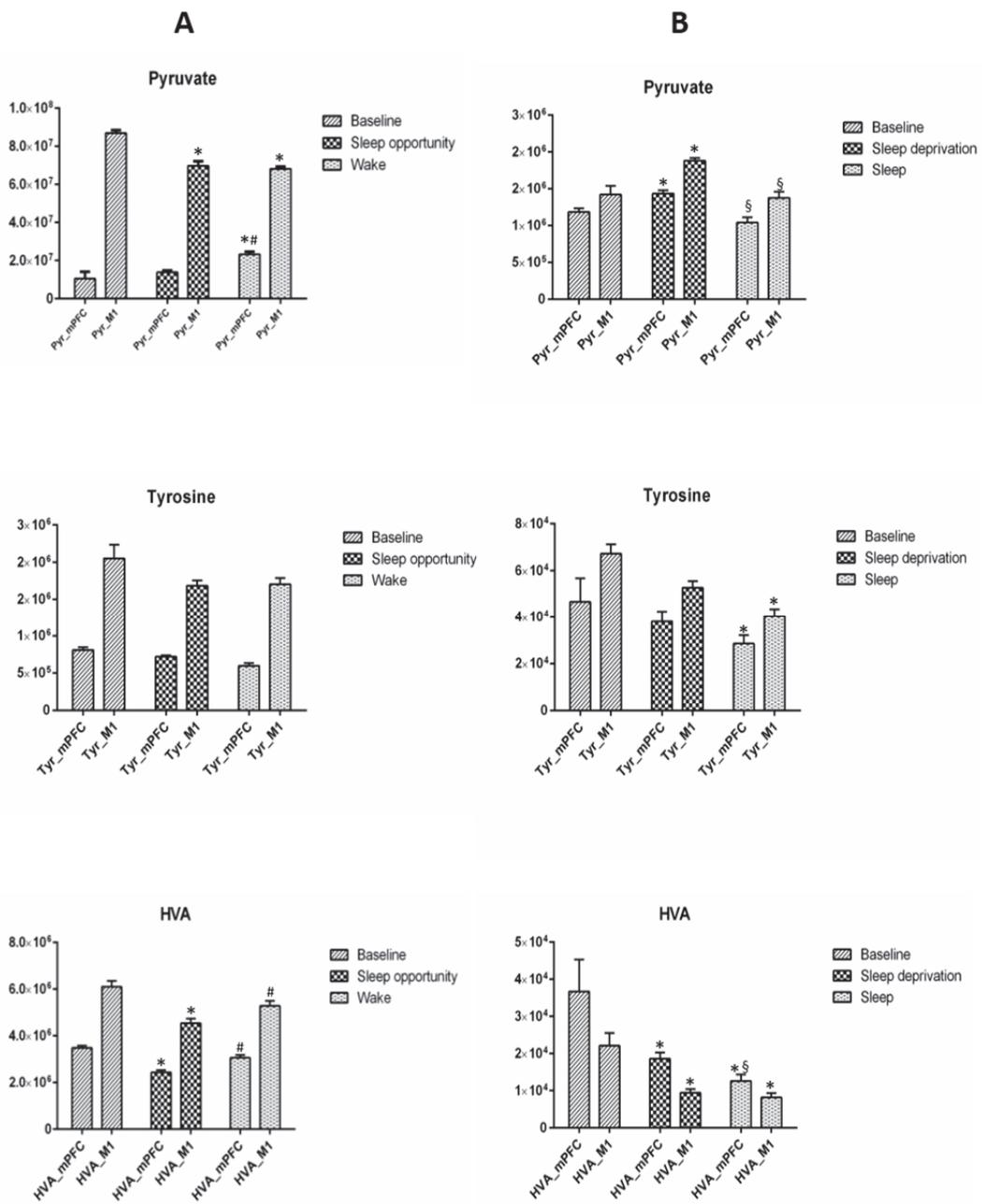


Figura 14.Variazione dei livelli di Piruvato, Tirosina e Acido Omovanillico (HVA) durante gli esperimenti di A) Sleep e B) Sleep Deprivation. * $p < 0,05$ vs Baselina, # $p < 0,05$ vs Sleep opportunity, § $p < 0,05$ vs Sleep deprivation.

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Taurina

La taurina (acido 2-aminoetansulfonico) è un componente dei sali biliari ed un composto ubiquitario di tutte le cellule animali. È uno degli amminoacidi liberi più abbondanti presenti nel cervello in molti, ma non in tutti i mammiferi, secondo solo al glutammato. È stato osservato che, durante lo sviluppo ontogenetico dei roditori, la concentrazione di taurina supera quella del glutammato. La taurina viene sintetizzata a partire da aminoacidi contenenti zolfo quali cisteina e metionina (Huxtable 1989) ed ha mostrato di essere un importante nutriente durante lo sviluppo per i gatti e probabilmente anche per i primati (Sturman 1993). Nel SNC non si comporta esattamente come un neurotrasmettitore ma piuttosto come un modulatore dell'attività sinaptica, uno stabilizzatore di membrana e come un fattore di regolazione del volume cellulare. In figura 15 A e B vengono mostrati i grafici riguardanti le variazioni dei livelli di taurina durante gli esperimenti di *sleep* e *sleep deprivation*. In entrambe le tipologie di esperimento non osserviamo una variazione significativa dei livelli di Taurina. Fig 15 A e B

Glutammato

Il glutammato è un aminoacido sintetizzato dal nostro organismo e nel SNC funge sia da neurotrasmettitore eccitatorio che da precursore dell'acido gamma amino butirrico (GABA). Il glutammato, come mostrato in figura 15 A, non presenta nessuna significativa variazione dei suoi livelli durante gli esperimenti di *sleep*. In fig. 15 B viene mostrato il grafico ottenuto dagli esperimenti di *sleep deprivation* in cui possiamo osservare una variazione dei livelli di glutammato. Rispetto alla baseline, in ambedue le regioni di interesse, non si osserva nessuna variazione durante la *sleep deprivation*. Possiamo osservare una significativa riduzione, rispettivamente del 53% e del 23%, durante il periodo di sonno ed una riduzione di circa il 29% ($p < 0,05$) durante il sonno rispetto alla veglia. La variazione dei livelli di glutammato durante il ciclo sonno veglia è stata ampiamente studiata ottenendo, tuttavia, risultati spesso differenti. Un incremento del glutammato è

stato osservato durante lo stato di attivazione dell'EEG nella corteccia, inoltre, Lena e collaboratori nel 2005 riscontrarono un aumento dei livelli di glutammato durante la veglia nel *nucleus accumbens* ma non osservarono variazioni significative nei campioni di dializzato provenienti dalla regione mPFC. (Lena, Parrot et al. 2005). Altri ricercatori identificarono un incremento del glutammato durante il sonno NREM nel talamo (Kekesi, Dobolyi et al. 1997) e durante il sonno REM nella medulla (Kodama, Lai et al. 1998). Tutti gli studi di microdialisi sono stati messi in discussione per la loro scarsa sensibilità temporale al rilascio sinaptico del glutammato. Inoltre, in tutti gli esperimenti sopra citati, i campioni venivano raccolti per un massimo di 2-6 ore durante la fase di luce, senza ricorrere agli effetti indotti dalla *sleep deprivation*. In questo modo gli effetti dovuti alla durata della veglia e alla pressione del sonno sui livelli di glutammato non potevano essere valutati. Dash e collaboratori, dopo avere vagliato tale ipotesi, per ovviare a questo problema, utilizzarono un biosensore per il glutammato impiantato in due diverse aree corticali, sensibile al rilascio sinaptico e con una elevata risoluzione temporale <1 s. Attraverso tale biosensore misurarono le variazioni dei livelli di glutammato durante il normale ciclo sonno veglia e in esperimenti di *sleep deprivation*. Essi osservarono un rapido incremento del glutammato durante la veglia e la fase REM ed un decremento durante il sonno NREM (Dash, Douglas et al. 2009). I risultati sperimentali sembrano essere perfettamente in linea con quanto ipotizzato da Dash e collaboratori. Infatti, negli esperimenti di *sleep* non osserviamo nessuna significativa variazione nei livelli di glutammato che, dunque, possiamo ricondurre alla bassa sensibilità temporale della tecnica utilizzata (che prevede un campionamento di 15 min). Al contrario, tale tecnica accoppiata agli effetti indotti da una veglia obbligata e prolungata (ottenuta mediante la *sleep deprivation*) ci hanno consentito di osservare una variazione dei livelli di glutammato ed in particolare una riduzione significativa di quest'ultimo durante il sonno che segue il periodo di privazione del sonno.

Glutamina

La glutamina è un aminoacido polare che nel SNC fa parte del ciclo glutammato-glutamina. In seguito al rilascio del glutammato, quest'ultimo viene rimosso dallo spazio sinaptico e, mediante un meccanismo di simporto con lo ione sodio, viene veicolato all'interno degli astrociti che lo convertono in glutamina. Quest'ultima, mediante l'attivazione della pompa Na^+/K^+ , viene estrusa dagli astrociti e fornita ai neuroni che la convertiranno in glutammato. Il ciclo glutammato-glutamina è ATP dipendente e tale energia proviene dalla glicolisi anaerobica (Newsholme P 2009). In figura 15 A e B sono rappresentati i grafici riguardanti la glutamina. In entrambe le tipologie di esperimento non sono state riscontrate variazioni significative dei livelli di glutamina.

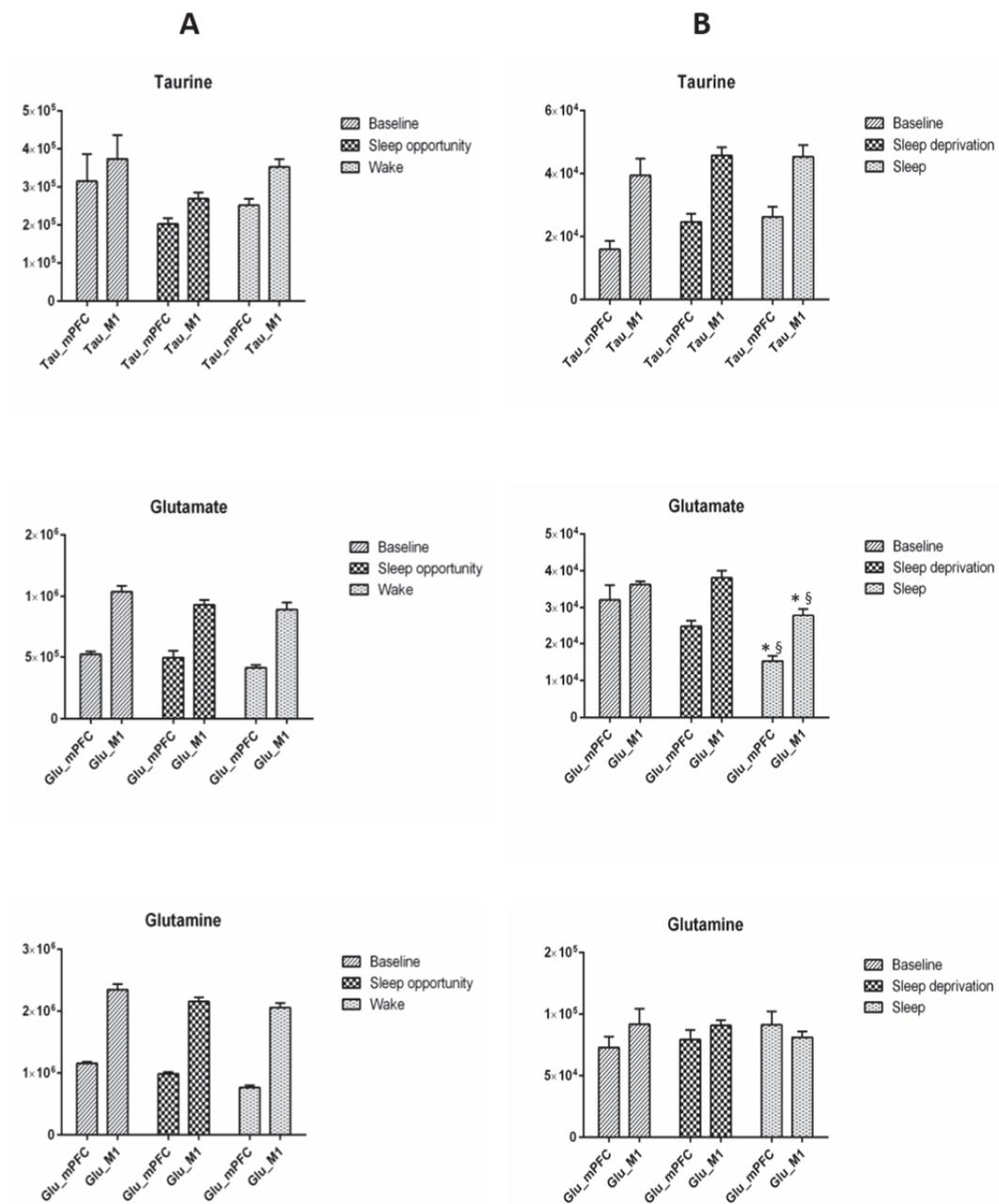


Figura 15. Variazione dei livelli di Taurina, Glutammato e Glutamina durante gli esperimenti di A) Sleep e B) Sleep Deprivation. * $p < 0,05$ vs Baseline, # $p < 0,05$ vs Sleep opportunity, § $p < 0,05$ vs Sleep deprivation.

Valine, Leucina/ Isoleucina

Valina, Leucina ed Isoleucina sono tre amminoacidi a catena ramificata o BCAA (Branche Chain Amino Acid) così chiamati poiché possiedono una catena di carbonio che si ramifica dalla struttura principale. Sono componenti essenziali che non possono essere sintetizzati per via endogena e devono essere necessariamente integrati attraverso la dieta. Oltre che essere importanti componenti strutturali delle proteine i BCAA sembrerebbero svolgere un ruolo nella regolazione del metabolismo proteico. Nel cervello, questi amminoacidi, esercitano una doppia influenza sulla produzione dei neurotrasmettitori. Funendo da donatori di azoto contribuiscono alla sintesi dell'amminoacido eccitatorio glutammato e del GABA. Inoltre, competono con il triptofano (precursore della serotonina) per il trasporto attraverso la barriera emato-encefalica così come la tirosina e la fenilalanina (precursori delle catecolammine) (Gastman 1998). Durante il sonno è stato osservato un notevole incremento della sintesi proteica cerebrale (Ramm and Smith 1990), è stato proposto che tale meccanismo sia fondamentale per il consolidamento della memoria (Hernandez and Abel 2008). Come illustrato in figura 16 A durante gli esperimenti di *sleep* osserviamo variazioni dei livelli di valina durante le diverse fasi sperimentali. Rispetto alla baseline, in entrambe le regioni di interesse, osserviamo un significativo incremento di tale molecola pari rispettivamente al 57.02% ed al 31,25% ($p < 0,05$) ma nessuna variazione durante il periodo di veglia obbligata. La valina, rispetto al periodo di *sleep*, presenta una riduzione pari al 52%, in mPFC, ed al 32,5% , in M1, durante la veglia obbligata. Nel pannello B della figura 16 viene mostrato il grafico riguardante le variazioni dei livelli di valina durante l'esperimento di *sleep deprivation*. Essa presenta variazioni significative nella regione M1. Rispetto alla baseline la valina mostra una riduzione del 24% durante il sonno che segue le 6 h di *sleep deprivation*. In fig 16 A viene mostrato il grafico che rappresenta le variazioni di concentrazione di leucina/isoleucina durante l'esperimento di *sleep*. Rispetto alla baseline, in entrambe le regioni, osserviamo un aumento di tale molecola rispettivamente del 55,7% e del 35% ($p < 0,05$) durante il sonno ma non durante il periodo di veglia

obbligata. Inoltre, la leucina presenta una significativa riduzione durante la veglia obbligata rispetto al sonno del 57,8 e del 23,7%. In fig 16 B viene mostrato il grafico che riporta le variazioni di tale molecola durante l'esperimento di *sleep deprivation*. Come possiamo osservare nel grafico non si sono verificate modificazioni significative. Dai grafici appena descritti si può evincere un andamento comune di entrambe le molecole che aumentano durante il sonno e si riducono durante la veglia. Hanno un andamento esattamente opposto a quello del glutammato. L'aumento durante il sonno delle concentrazioni extracellulari di valina e leucina/isoleucina potrebbe essere in relazione ad un aumento del loro trasporto nel sistema nervoso centrale in quanto necessarie per la sintesi proteica.

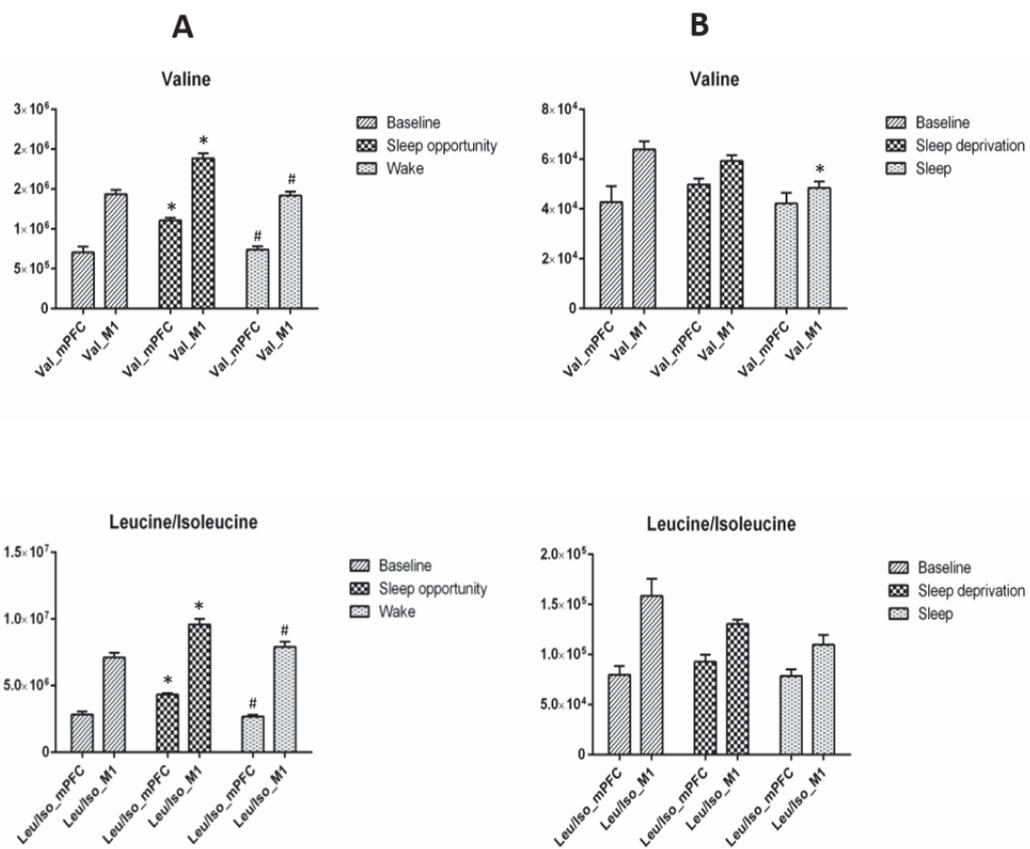


Figura 16. Variazione dei livelli di Valina e Leucina/Isoleucina durante gli esperimenti di A) Sleep e B) Sleep Deprivation. * p< 0,05 vs Baselina, # p<0,05 vs Sleep opportunity, § p< 0,05 vs Sleep deprivation.

Acido urico

L'Acido urico (UA) è il prodotto finale del catabolismo dei nucleotidi purinici e viene considerato uno fra i più potenti antiossidanti.. L'acido urico (fig 17 A) non ha mostrato significative variazioni durante l'esperimento di *sleep*. Tuttavia, possiamo osservare, come, negli esperimenti di *sleep deprivation* (fig 17 B) ci sia una interessante variazione dei livelli di acido urico. Rispetto alla baseline, non si osserva nessuna significativa variazione durante la *sleep deprivation*, in mPFC, che invece possiamo osservare in M1 con un aumento del 28% ($p < 0,05$). In entrambe le regioni, in relazione alla baseline, non si osservano significative variazioni durante il sonno. Possiamo osservare come, rispetto al periodo di *sleep deprivation*, tale molecola mostri durante il sonno una significativa riduzione pari al 36,65%, in mPFC, ed al 24,2% in M1. Evidenze indirette, molteplici teorie così come il senso comune suggeriscono che il sonno sia necessario per incrementare il metabolismo energetico. Dalla letteratura è noto che la produzione di ATP aumenta durante il sonno e si riduce durante la veglia a causa del suo impiego (Dworak, McCarley et al. 2010). L'ATP, mediante una serie di reazioni enzimatiche, viene convertito in ipoxantina che ad opera della xantina ossidasi (XO) viene metabolizzata in xantina ed infine in acido urico. Molteplici lavori scientifici riportano che l'acido urico funge da scavenger nei confronti del perossinitrito, ma anche da antiossidante verso la dopamina e l'acido ascorbico. (Sevanian, Davies et al. 1991; Church and Ward 1994). In seguito al normale metabolismo della dopamina da parte delle MAO si ha la produzione di diverse specie reattive dell'ossigeno (ROS) tra cui il radicale superossido (Halliwell 1992). Quest'ultimo reagendo con l'ossido nitrico, prodotto dalle ossido nitrico sintasi neuronali (nNOS), conduce alla sintesi di perossinitrito. Durante la veglia, in seguito al maggior rilascio di dopamina, avremo una elevata produzione di perossinitrito. L'aumento dei livelli di acido urico durante la veglia, perciò, potrebbero essere necessari a prevenire gli effetti dannosi causati da stress ossidativo.

Acetoacetato

L'acetoacetato è il principale corpo chetonico. L'impiego energetico dell'acetoacetato ne richiede la sua attivazione ad acetoacetyl-CoA che a sua volta viene scisso in due molecole di Acetyl-CoA. Il cervello, in seguito ad un digiuno prolungato può utilizzare come fonte di energia i corpi chetonici che, a differenza degli acidi grassi, sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica. Perciò l'impiego dei corpi chetonici determina una modificazione del metabolismo che in quel momento non può utilizzare il glucosio come fonte di energia. L'acetoacetato (fig 17 A) rispetto alla baseline, in entrambe le regioni, mostra una riduzione del 50% sia durante il periodo di *sleep opportunity* che durante la veglia obbligata ma nessuna variazione tra il periodo di sonno e veglia obbligata. Nell'esperimento di *sleep deprivation* (fig 17 B), in mPFC, rispetto alla baseline osserviamo una riduzione significativa dell'acetoacetato del 36% durante il periodo di *sleep deprivation* variazione che non si riscontra durante il sonno e tra il periodo di *sleep deprivation* ed il sonno. Nella regione M1 possiamo osservare, rispetto alla baseline, una riduzione del 49% durante la SD e del 41,30% ($p < 0,05$) durante il sonno rispetto alla baseline. Tuttavia non si osserva nessuna variazione tra il periodo di *sleep deprivation* e sonno. Studi futuri ci consentiranno di comprenderne il suo ruolo nel ciclo sonno veglia.

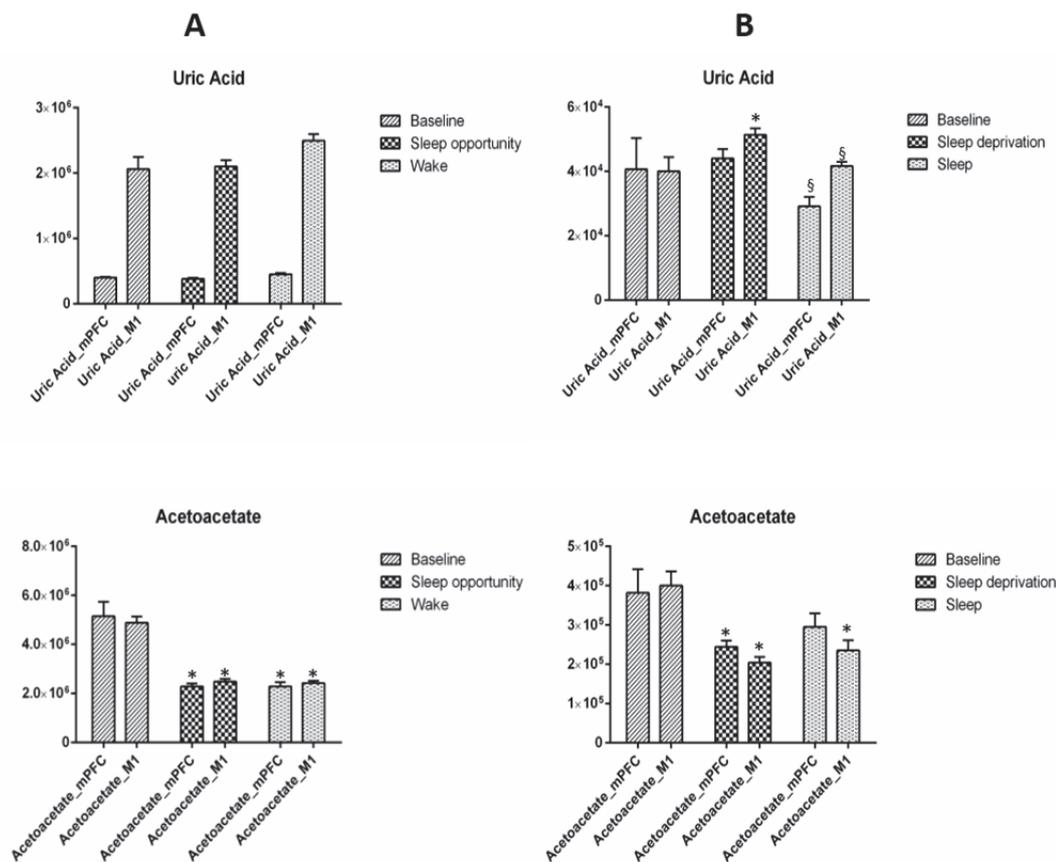


Figura 17. Variazione dei livelli di Acido Urico e Acetoacetato durante gli esperimenti di A) Sleep e B) Sleep Deprivation. * p< 0,05vs Baselina, # p<0,05 vs Sleep opportunity, § p< 0,05vs Sleep deprivation.

In tutte le tipologie sperimentali il campionamento microdialitico è stato effettuato insieme alla concomitante registrazione dei tracciati elettroencefalografici che ci hanno permesso di quantificare la percentuale di veglia totale durante le 24 ore in cui si svolgeva l'esperimento. Nell'esperimento di *sleep* i topi sono stati svegli per il 50% del tempo e durante le 6 ore di *sleep opportunity* hanno dormito per circa il 71%. Nell'esperimento di *sleep deprivation* i topi presentano una percentuale di veglia pari al 39% nelle 24 ore e durante le 6 h una percentuale di veglia del 95%. Tali risultati ci hanno consentito di poter effettivamente correlare le variazioni percentuali dei vari metaboliti nei differenti stati di coscienza (fig 18).

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

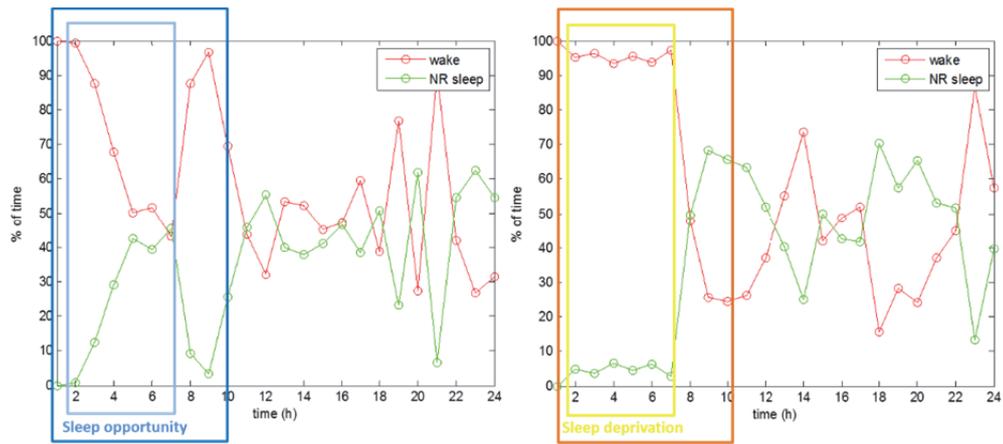


Figura 18. Variazione percentuale della veglia e del sonno durante le 24 h, nel riquadro blu sono evidenziate le 11 ore dell'esperimento di *sleep* e nel riquadro azzurro le 6 h di *sleep opportunity*. Nel riquadro arancio viene evidenziato l'esperimento di *sleep deprivation* ed in particolare in quello giallo le 6 h di *sleep deprivation*.

Conclusioni

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

La presente tesi di Dottorato ha avuto come oggetto lo studio delle variazioni neurochimiche extracellulari corticali in diversi stati di coscienza, attraverso l'utilizzo di strumenti analitici innovativi. Tali strumenti sono stati sviluppati a seguito della collaborazione tra diversi centri di ricerca internazionali (Università degli studi di Sassari, Università Politecnica di Timisoara, Università di Wisconsin-Madison, Università di Tennessee Knoxville). L'impianto dei microsensori in MWCNTs in topo C57Bl, ha reso possibile per la prima volta il monitoraggio in tempo reale delle variazioni dei livelli di acido ascorbico corticale in associazione alle registrazioni elettroencefalografiche ed elettromiografiche. Queste ultime hanno consentito di associare lo studio elettrofisiologico (EEG e EMG) alle variazioni dei livelli extracellulari di AA durante i diversi stati: veglia, sonno REM e NREM. Lo studio della neurochimica corticale effettuato mediante esperimenti *in vivo* di microdialisi associata alla tecnica HPLC/ORBITRAP apre nuovi orizzonti analitici con la possibilità di studiare centinaia di molecole nell'ordine delle pMoli o fMoli/litro. I dati preliminari ottenuti fin ora confermano il trend di alcune molecole note come piruvato, glutammato che aumentano durante la veglia e si riducono durante il sonno a conferma del ruolo di tali molecole nell'induzione dello stato di veglia. È da definire il ruolo di altri metaboliti attualmente oggetto di studio. Dal punto di vista tecnico i microsensori e la microdialisi hanno confermato i loro vantaggi ed i loro limiti analitici. I microsensori infatti hanno consentito il monitoraggio di AA con un'alta risoluzione temporale consentendo la sua quantificazione in tempo reale sulla stessa scala temporale dei segnali EEG ed EMG. La microdialisi, pur non offrendo la stessa risoluzione temporale ha consentito, tuttavia, la quantificazione di moltissime molecole contemporaneamente. Il limite analitico più importante della microdialisi è risultato sicuramente legato alla scarsa risoluzione di fenomeni fasici (es. il release di glutammato) ma, in associazione alla HPLC/ORBITRAP si è dimostrata una tecnica potentissima nello studio metabolomico della neurochimica stato-dipendente. A tutt'oggi l'associazione microdialisi/HPLC-ORBITRAP si conferma essere la tecnica più sofisticata per lo

studio dinamico degli spazi extracellulari e nella presente ricerca è stata applicata per la prima volta nello studio neurochimico del sonno.

Bibliografia

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

- Abrahamson, E. E., R. K. Leak, et al. (2001). "The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems." Neuroreport **12**(2): 435-440.
- Adrian, E. D. (1935). "The origin of the Berger rhythm." Brain Res **58**: 323-351.
- Agus, D. B. (1997). "Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters." The Journal of clinical investigation **100**(11): 2842-2848.
- Alessandri, B., H. Landolt, et al. (1996). "Application of glutamate in the cortex of rats: a microdialysis study." Acta Neurochir Suppl **67**: 6-12.
- Allison, T., H. Van Twyver, et al. (1972). "Electrophysiological studies of the echidna, *Tachyglossus aculeatus*. I. Waking and sleep." Arch Ital Biol **110**(2): 145-184.
- Amin, F., M. Davidson, et al. (1992). "Homovanillic acid measurement in clinical research: a review of methodology." Schizophr Bull **18**(1): 123-148.
- Amzica, F. (1992). "Delta frequency (1–4 Hz) oscillations of perigeniculate thalamic neurons and their modulation by light." Neuroscience **51**: 285-294.
- Aserinsky, E. (1953). "Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep." Science **118**: 273-274.
- Aston-Jones, G. and F. E. Bloom (1981). "Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle." J Neurosci **1**(8): 876-886.
- Basheer, R., T. Porkka-Heiskanen, et al. (2000). "Adenosine as a Biological Signal Mediating Sleepiness following Prolonged Wakefulness." Neurosignals **9**(6): 319-327.
- Bellesi, M., G. Tononi, et al. (2015). "Region-Specific Dissociation between Cortical Noradrenaline Levels and the Sleep/ Wake Cycle." Sleep.
- Benington, J. H. and H. C. Heller (1995). "Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep." Prog Neurobiol **45**(4): 347-360.
- Berger, H. (1929). "Über das Elektrenkephalogramm des Menschen." Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten **87**(1): 527-570.
- Berridge, C. W. (2008). "Noradrenergic modulation of arousal." Brain Res Rev **58**(1): 1-17.
- Bizzi, E. (1963). "Functional connections between pontine reticular formation and lateral geniculate nucleus during deep sleep." **101**: 666-680.
- Borbely, A. A. and P. Achermann (1992). "Concepts and models of sleep regulation: an overview." J Sleep Res **1**(2): 63-79.
- Brown, R. E. (2012). "CONTROL OF SLEEP AND WAKEFULNESS." Physiol Rev **92**: 1087–1187,.
- Buzsaki, G. and A. Draguhn (2004). "Neuronal oscillations in cortical networks." Science **304**(5679): 1926-1929.
- Canolty, R. T. (2006). "High Gamma Power Is Phase-Locked to Theta Oscillations in Human Neocortex." Science **313**: 1626-1628.
- Carskadon, M. A. (2011). Monitoring and staging human sleep. Principles and practice of sleep medicine, M. H. Kryger. St. Louis, Elsevier Saunders: 16-26.
- Church, W. H. and V. L. Ward (1994). "Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease: effect on dopamine oxidation." Brain Res Bull **33**(4): 419-425.
- Clements, J. D. (1996). "Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function." Trends Neurosci **19**(5): 163-171.

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

- Dang-Vu, T. T., M. Schabus, et al. (2008). "Spontaneous neural activity during human slow wave sleep." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15160-15165.
- Dantz, B., D. M. Edgar, et al. (1994). "Circadian rhythms in narcolepsy: studies on a 90 minute day." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **90**(1): 24-35.
- Dash, M. B., C. L. Douglas, et al. (2009). "Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states." J Neurosci **29**(3): 620-629.
- Datta, S. (1997). "Cellular basis of pontine ponto-geniculo-occipital wave generation and modulation." Cell Mol Neurobiol **17**(3): 341-365.
- Dement, W. (1957). "Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **9**: 673-690.
- DERK-JAN, D. (2002). "Functional Genomics of Sleep and Circadian Rhythm Invited Review: Integration of human sleep-wake regulation and circadian rhythmicity." J Appl Physiol **92**: 852-862.
- Diekelman, S. (2010). "the memory function of sleep." Nature **11**: 114-126.
- Dijk, D.-J. and C. A. Czeisler (1994). "Paradoxical timing of the circadian rhythm of sleep propensity serves to consolidate sleep and wakefulness in humans." Neurosci Lett **166**(1): 63-68.
- Dijk, D. J., D. G. M. Beersma, et al. (1987). "EEG Power Density during Nap Sleep: Reflection of an Hourglass Measuring the Duration of Prior Wakefulness." Journal of Biological Rhythms **2**(3): 207-219.
- Dijk, D. J. and C. Cajochen (1997). "Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG." J Biol Rhythms **12**(6): 627-635.
- Dworak, M., R. W. McCarley, et al. (2010). "Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep." J Neurosci **30**(26): 9007-9016.
- Fenik, V. B., I. Rukhadze, et al. (2008). "Inhibition of pontine noradrenergic A7 cells reduces hypoglossal nerve activity in rats." Neuroscience **157**(2): 473-482.
- Finelli, L. A., H. Baumann, et al. (2000). "Dual electroencephalogram markers of human sleep homeostasis: correlation between theta activity in waking and slow-wave activity in sleep." Neuroscience **101**(3): 523-529.
- Flanigan, W. F., Jr. (1973). "Sleep and wakefulness in iguanid lizards, *Ctenosaura pectinata* and *Iguana iguana*." Brain Behav Evol **8**(6): 401-436.
- Flanigan, W. F., Jr., R. H. Wilcox, et al. (1973). "The EEG and behavioral continuum of the crocodilian, *Caiman sclerops*." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **34**(5): 521-538.
- Fonck, C. (2005). "Novel seizure phenotype and sleep disruptions in knock-in mice with hypersensitive alpha nicotinic receptors." Journal of Neuroscience **25**: 11396-11411.
- Fonck, C., B. N. Cohen, et al. (2005). "Novel seizure phenotype and sleep disruptions in knock-in mice with hypersensitive alpha 4* nicotinic receptors." J Neurosci **25**(49): 11396-11411.
- Fox, P. T. (2003). "Brain imaging in stuttering: where next?" J Fluency Disord **28**(4): 265-272.
- Franco-Pérez, J. (2012). "Major neurotransmitters involved in the regulation of sleep-wake cycle" Revista de investigación clínica.

- Franken, P. (2001). "The Homeostatic Regulation of Sleep Need Is under Genetic Control." The Journal of Neuroscience **21(8)**: 2610-2621.
- Gastman, U. A. (1998). "Overtraining and the BCAA hypothesis." Medicine and Science in Sports and Exercise **30(7)**: 1173-1178.
- Goldstein, M. (1995). Enzymes Involved in the Catalysis of Catecholamine Biosynthesis. N. Marks, Springer.
- Gray, L. R., S. C. Tompkins, et al. (2014). "Regulation of pyruvate metabolism and human disease." Cell Mol Life Sci **71(14)**: 2577-2604.
- Grunewald, R. A. and M. Fillenz (1984). "Release of ascorbate from a synaptosomal fraction of rat brain." Neurochem Int **6(4)**: 491-500.
- Halliwell, B. (1992). "Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System." J Neurochem **59(5)**: 1609-1623.
- Hasselmo, M. E. (2005). "What is the function of hippocampal theta rhythm?--Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data." Hippocampus **15**: 936-949.
- Herculano-Houzel, S (1999). "Precisely Synchronized Oscillatory Firing Patterns Require Electroencephalographic Activation." The Journal of Neuroscience **19**: 3993-4010.
- Hernandez, P. J. and T. Abel (2008). "The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate." Neurobiology of Learning and Memory **89(3)**: 293-311.
- Hirase, M., T. Ishida, et al. (2008). "Rebound insomnia induced by abrupt withdrawal of hypnotics in sleep-disturbed rats." Eur J Pharmacol **597(1-3)**: 46-50.
- Hornig, D. (1975). "Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals." Ann N Y Acad Sci **258**: 103-118.
- Huxtable, R. J. (1989). "Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine." Prog Neurobiol **32(6)**: 471-533.
- John, D. (1997). "Dopamine Synthesis, Uptake, Metabolism, and Receptors: Relevance to Gene Therapy of Parkinson's Disease." EXPERIMENTAL NEUROLOGY **144**: 4-9.
- Jouvet (1962). "Recherches sur les structures nerveuses et les mecanismes responsables des differentes phases du sommeil physiologique." Arch Ital Biol **100**: 125-206.
- Kahana, M. J. (2006). "The cognitive correlates of human brain oscillations." J Neurosci **26(6)**: 1669-1672.
- Kalinchuk, A. V., A. S. Urrila, et al. (2003). "Local energy depletion in the basal forebrain increases sleep." Eur J Neurosci **17(4)**: 863-869.
- Kekesi, K. A., A. Dobolyi, et al. (1997). "Slow wave sleep is accompanied by release of certain amino acids in the thalamus of cats." Neuroreport **8(5)**: 1183-1186.
- Kodama, T., Y. Y. Lai, et al. (1998). "Enhanced glutamate release during REM sleep in the rostromedial medulla as measured by in vivo microdialysis." Brain Res **780(1)**: 178-181.
- Koppel, N. (2000). "Gamma rhythms and beta rhythms have different synchronization properties." National Academy of Sciences **97**: 1867-1872.
- Kumar, R. (2008). "Approved and investigational uses of modafinil : an evidence-based review." Drugs **68(13)**: 1803-1839.
- Lam, D. K. C. and P. M. Daniel (1986). "THE INFLUX OF ASCORBIC ACID INTO THE RAT'S BRAIN." Quarterly Journal of Experimental Physiology **71(3)**: 483-489.

Giovanna Maria Spano; Monitoraggio real-time della neurochimica corticale in topi liberi di muoversi durante il sonno, la privazione di sonno e la veglia mediante microdialisi in vivo e neurosensori amperometrici; Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

- Lancel, M., T. A. Cronlein, et al. (1996). "Role of GABAA receptors in sleep regulation. Differential effects of muscimol and midazolam on sleep in rats." Neuropsychopharmacology **15**(1): 63-74.
- Lee, M. G., O. K. Hassani, et al. (2005). "Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep." J Neurosci **25**(17): 4365-4369.
- Lee, S. B., S. K. Beak, et al. (2009). "Collateral projection from the locus coeruleus to whisker-related sensory and motor brain regions of the rat." J Comp Neurol **514**(4): 387-402.
- Lena, I., S. Parrot, et al. (2005). "Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep-wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats." J Neurosci Res **81**(6): 891-899.
- Lesku, J. A. (2006). The evolution of sleep: A phylogenetic approach. Sleep: A comprehensive handbook. T.-L. Chiong, Jhon Wiley & Sons. Inc.
- Lopes Da Silva, F. H. and W. Storm Van Leeuwen (1977). "The cortical source of the alpha rhythm." Neurosci Lett **6**(2-3): 237-241.
- Mamedov, A. A., N. A. Kotov, et al. (2002). "Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites." Nat Mater **1**(3): 190-194.
- Moruzzi, G. and H. W. Magoun (1995). "Brain stem reticular formation and activation of the EEG. 1949." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **7**(2): 251-267.
- Naylor, E., B. M. Bergmann, et al. (2000). "The Circadian Clock Mutation Alters Sleep Homeostasis in the Mouse." The Journal of Neuroscience **20**(21): 8138-8143.
- O'Neill, R. D., R. A. Grunewald, et al. (1983). "The effect of unilateral cortical lesions on the circadian changes in rat striatal ascorbate and homovanillic acid levels measured in vivo using voltammetry." Neurosci Lett **42**(1): 105-110.
- Ohno, K. and T. Sakurai (2008). "Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness." Front Neuroendocrinol **29**(1): 70-87.
- Oke, O. O., A. Magony, et al. (2010). "High-frequency gamma oscillations coexist with low-frequency gamma oscillations in the rat visual cortex in vitro." Eur J Neurosci **31**(8): 1435-1445.
- Overeem, S., T. E. Scammell, et al. (2002). "Hypocretin/orexin and sleep: implications for the pathophysiology and diagnosis of narcolepsy." Current Opinion in Neurology **15**(6): 739-745.
- Pal, D. and B. N. Mallick (2006). "Role of noradrenergic and GABA-ergic inputs in pedunculopontine tegmentum for regulation of rapid eye movement sleep in rats." Neuropharmacology **51**(1): 1-11.
- Pèrez, J. F. (2012). "Major neurotransmitters involved in the regulation of sleep-wake cycle." Revista de investigación clínica **64**: 182-191.
- Ramm, P. and C. T. Smith (1990). "Rates of cerebral protein synthesis are linked to slow wave sleep in the rat." Physiol Behav **48**(5): 749-753.
- Ray, W. J. (1985). "EEG alpha activity reflects attentional demands, and beta activity reflects emotional and cognitive processes." Science **10**: 750-752.
- Reich, P., S. J. Geyer, et al. (1972). "Metabolism of brain during sleep and wakefulness." J Neurochem **19**(2): 487-497.
- Rice, M. E. (2000). "Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain." Trends Neurosci **23**(5): 209-216.

- Rice, M. E., E. J. Lee, et al. (1995). "High levels of ascorbic acid, not glutathione, in the CNS of anoxia-tolerant reptiles contrasted with levels in anoxia-intolerant species." J Neurochem **64**(4): 1790-1799.
- Rivas, G. A., M. D. Rubianes, et al. (2007). "Carbon nanotubes for electrochemical biosensing." Talanta **74**(3): 291-307.
- Sakurai, T., A. Amemiya, et al. (1998). "Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior." Cell **92**(4): 573-585.
- Sevanian, A., K. J. Davies, et al. (1991). "Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid." Am J Clin Nutr **54**(6 Suppl): 1129S-1134S.
- Shapiro, C. M. and M. J. Flanigan (1993). "ABC of sleep disorders. Function of sleep." BMJ **306**(6874): 383-385.
- Siegel, J. M. (2004). "Hypocretin (OREXIN): Role in Normal Behavior and Neuropathology." Annual Review of Psychology **55**: 125-148.
- Siegel, J. M. (2004). "The Neurotransmitters of Sleep." Journal of Clinical Psychiatry **65**(Suppl16): 4-7.
- Siegel, J. M., P. R. Manger, et al. (1998). "Monotremes and the evolution of rapid eye movement sleep." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353**(1372): 1147-1157.
- Siegel, J. M., P. R. Manger, et al. (1999). "Sleep in the platypus." Neuroscience **91**(1): 391-400.
- Spector, R. and A. V. Lorenzo (1973). "Ascorbic acid homeostasis in the central nervous system." Am J Physiol **225**(4): 757-763.
- Stahl, S. M. (2012). Disorders of Sleep, Wakefulness and their Treatment. Stahl's Self-Assessment Examination in Psychiatry Multiple Choice Questions for Clinicians. C. Medicine, Cambridge University Press.
- Steriade, M. (2005). Brain Electrical Activity and Sensory Processing during Waking and Sleep States. Principles and Practice of Sleep Medicine. M. H. Kryger. Philadelphia, Elsevier Saunders: 101-119.
- Steriade, M. (2006). "Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems." Neuroscience **137**(4): 1087-1106.
- Steriade, M., F. Amzica, et al. (1996). "Synchronization of fast (30-40 Hz) spontaneous cortical rhythms during brain activation." J Neurosci **16**(1): 392-417.
- Steriade, M., A. Nunez, et al. (1993). "A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components." J Neurosci **13**(8): 3252-3265.
- Stoyanova, I., W. L. Rutten, et al. (2010). "Orexin-A and orexin-B during the postnatal development of the rat brain." Cell Mol Neurobiol **30**(1): 81-89.
- Sturman, J. A. (1993). "Taurine in development." Physiol Rev **73**(1): 119-147.
- Suntsova, N., R. Guzman-Marin, et al. (2007). "The median preoptic nucleus reciprocally modulates activity of arousal-related and sleep-related neurons in the perifornical lateral hypothalamus." J Neurosci **27**(7): 1616-1630.
- Toh, K. L. (2001). "An hPer2 Phosphorylation Site Mutation in Familial Advanced Sleep Phase Syndrome." Science **291**: 1040-1043.
- Tononi, G. and C. Cirelli (2006). "Sleep function and synaptic homeostasis." Sleep Med Rev **10**(1): 49-62.
- Wehr, T. A. (1996). "'clock for all seasons" in the human brain." Prog Brain Research **111**: 321-342.

- Wilson, J. X. (1989). "Ascorbic acid uptake by a high-affinity sodium-dependent mechanism in cultured rat astrocytes." J Neurochem **53**(4): 1064-1071.
- Wilson, J. X., C. E. Peters, et al. (2000). "Glutamate stimulates ascorbate transport by astrocytes." Brain Res **858**(1): 61-66.
- Xueping, Y., L. Jie, et al. (2015). "Surface functionalization of carbon nanotubes by direct encapsulation with varying dosages of amphiphilic block copolymers." Nanotechnology **26**(32): 325601.