



**Università degli studi di Sassari**

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Materno Infantili**

*Sezione di Farmacologia*

(Direttore: Prof.ssa Maria Speranza Desole)

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE**

**INDIRIZZO IN NEUROSCIENZE**

**Ciclo: XXII**

**Studio, in tempo reale, del metabolismo energetico  
striatale in ratti *freely moving*: sviluppo e  
caratterizzazione di neurobiosensori integrati in  
un sistema biotelemetrico.**

**Tutor:**  
**Prof. Pier Andrea Serra**

**Presidente Scuola di Dottorato:**  
**prof. Eusebio Tolu**

***Tesi di dottorato della Dott.ssa Giulia Maria Grazia Puggioni***

**Anno Accademico 2008-2009**



## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 L'ossigeno</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 L'acido ascorbico</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Il glucosio</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4 Il lattato</b> .....	<b>6</b>
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b> .....	<b>9</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1 Hardware del sistema telemetrico</b> .....	<b>11</b>
<b>3.2 Firmware e software</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3 Sensore di movimento</b> .....	<b>22</b>
<b>3.4 Reagenti e soluzioni</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5 Microsensore per l'ossigeno</b> .....	<b>25</b>
<b>3.6 Microsensore per l'acido ascorbico</b> .....	<b>28</b>
<b>3.7 Biosensore per il glucosio</b> .....	<b>30</b>
<b>3.8 Biosensore per il lattato</b> .....	<b>32</b>
<b>3.9 Animali</b> .....	<b>35</b>
<b>3.10 Chirurgia stereotassica</b> .....	<b>36</b>
<b>3.11 Istologia</b> .....	<b>38</b>
<b>3.12 Analisi statistica</b> .....	<b>39</b>
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1 Ossigeno striatale</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2 Acido ascorbico striatale</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3 Glucosio striatale</b> .....	<b>45</b>
<b>4.4 Lattato striatale</b> .....	<b>46</b>
<b>4.5 Movimento durante l'attivazione neuronale</b> .....	<b>47</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSIONI</b> .....	<b>58</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>61</b>
<b>8. RIASSUNTO</b> .....	<b>67</b>



## 1. INTRODUZIONE

I pathway neurochimici implicati nella fisiologia cerebrale o nella patogenesi delle malattie neurodegenerative sono per lo più sconosciuti. Lo studio delle variazioni di importanti specie chimiche a basso peso molecolare può aiutarci a chiarirle meglio, soprattutto nelle prime fasi di malattia. Oggi giorno l'uso più frequente della biotelemetria in medicina è costituito dal suo utilizzo nelle unità intensive cardiovascolari, oppure in sistemi ospedalieri ad alta tecnologia quantunque qualsiasi segnale fisiologico possa essere trasmesso (FCC, 200; leuher, 1983; Zhou et al., 2002).

Un sistema biotelemetrico, può essere integrato con microsensori e biosensori amperometrici capaci di leggere le variazioni in tempo reale nelle concentrazioni di importanti molecole presenti nel sistema nervoso centrale (SNC) molte delle quali implicate nel metabolismo energetico cerebrale (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009). Le unità biotelemetriche impiantabili proposte in questa tesi derivano da sistemi precedentemente pubblicati (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009 ). Una volta sviluppato, questo sistema è stato usato con successo per la lettura di ossigeno, acido ascorbico, glucosio e lattato nello striato a seguito di una breve attivazione della

via glutammatergica cortico-striatale. L'analisi dei segnali derivati dai sensori specifici per queste molecole, ha consentito di intraprendere lo studio in tempo reale di pathway biochimici implicati nel metabolismo energetico cerebrale

### 1.1 L'ossigeno

l'Ossigeno molecolare (O<sub>2</sub>), essenziale per l'attività dell' SNC, è utilizzato non solo per la respirazione cellulare ma anche per la sintesi e metabolismo di varie ed importanti biomolecole come steroidi, eicosanoidi (prostaglandine) e sostanze neuroattive (Watanabe et al., 1997). E' anche implicato in molte reazioni biochimiche, come ad esempio, la produzione di ATP nel cervello (Bazzu et al., 2009). Il monitoraggio istantaneo delle concentrazioni di ossigeno e le relative variazioni, può dare importanti informazioni circa il metabolismo energetico nel cervello legato al consumo di glucosio (Fillenz, 2005) o di lattato (Aubert et al., 2005). La riduzione elettrochimica dell'ossigeno è ottenuta amperometricamente attraverso complesse trasformazioni che avvengono sulla superficie di un sensore di carbon-epoxy ad un potenziale di - 400 mV rispetto ad un elettrodo di riferimento (RE) in argento/cloruro d'argento (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009), come segue:



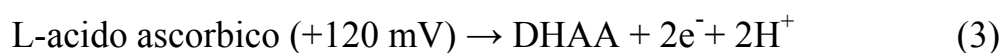


In virtù delle sue caratteristiche anatomiche e fisiologiche, il SNC è particolarmente sensibile allo stress ossidativo (Emerit et al., 2005). Questo, è reputato responsabile della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS). Tale particolare tipo di stress è cruciale per la modulazione di importanti funzioni cellulari come l'apoptosi, la mobilitazione del calcio, il trasporto ionico e tutti i fenomeni implicati nella eccitossicità (Emerit & Edeas, 2005). Lo stress ossidativo ha inizio da uno sfalsamento degli equilibri esistenti tra la capacità fisiologica di produrre antiossidanti nel SNC e la sintesi e produzione di radicali liberi (Andersen, 2004). Questo disequilibrio ci fa capire l'estrema importanza delle dinamiche concernenti gli antiossidanti, così come i radicali liberi, nel SNC.

## **1.2 L'acido ascorbico**

L' Acido Ascorbico (AA) è il più importante componente del pool antiossidante nel cervello (Serra et al., 2002). Questa molecola a basso peso molecolare, è una vitamina idrosolubile che esercita le sue proprietà di scavenger nei confronti dei ROS e degli RNS (Serra et al., 2002). Non viene prodotto nel nostro organismo ma viene introdotto

con la dieta (Hediger, 2002) e la presenza di uno specifico trasportatore attivo sodio-dipendente (SVCT2) consente la sua internalizzazione nei neuroni dove la sua concentrazione raggiunge livelli estremamente elevati (10 mM). L'AA è rapidamente ossidato ad acido deidroascorbico (DHAA) il quale, a sua volta, va incontro ad una idrolisi irreversibile trasformandosi in acido 2,3-dicheto-gulonico. All'interno dell'astrocita il deidroascorbato viene subito riconvertito nella sua forma ridotta (acido ascorbico), per essere immediatamente captato dai neuroni tramite L'SVCT2. Tale ciclo, che previene la perdita di vitamina C, spiega la dominante presenza di questa vitamina all'interno dei neuroni (Rice, 2000) ed il suo ruolo centrale nel SNC. L' Acido Ascorbico è implicato nella protezione contro l' eccitotossicità legata alle alte concentrazioni di glutammato, soprattutto in virtù di un eteroscambio ascorbato-glutammato (Rice, 2000). L' AA è velocemente ossidato sulla superficie di un elettrodo in epoxy-carbon applicando un potenziale di + 120 mV contro un elettrodo di riferimento Ag/AgCl, come riportato nella seguente reazione:

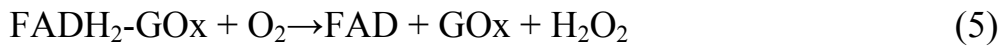
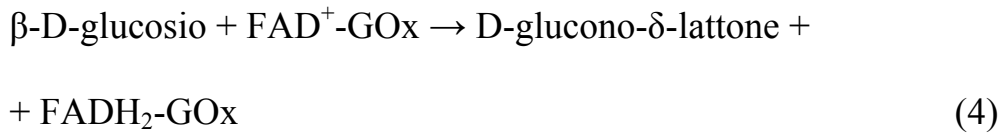




### 1.3 Il glucosio

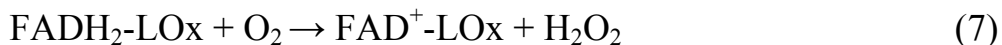
Il glucosio (Glu) è una molecola attivamente implicata nella sintesi dell'ATP e la sua concentrazione negli spazi extracellulari è il fattore più importante per il controllo del metabolismo energetico (Lowry et al., 1998; Magistretti et al., 1999; Fillenz et al., 2005). Molte molecole interessanti dal punto di vista biologico, come il glucosio, non possono essere ossidate in condizioni standard sulla superficie di un sensore, in questo caso è necessario utilizzare un biosensore (Pantano et al., 1995). Il biosensore combina un trasduttore del segnale elettrico con un elemento biologico (per esempio un enzima) capace di attribuire al sensore un elevato grado di sensibilità e soprattutto di specificità (Scheller et al., 1995).

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



#### 1.4 Il lattato

Come il glucosio, anche il lattato (Lat) è un'importante molecola implicata nella bioenergetica cerebrale, come prodotto della glicolisi (Fillenz et al., 2005) o come substrato energetico dei neuroni (Magistretti et al., 1999). Il lattato viene ossidato dalla lattato ossidasi (LOx). Come la GOx anche LOx è legato covalentemente al cofattore FAD (Serra et al., 2007). Dopo l'ossidazione del substrato un'ulteriore ossidazione del FADH<sub>2</sub> a FAD<sup>+</sup> produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presenza di O<sub>2</sub>.



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



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

Le caratteristiche chimiche intrinseche delle molecole: O<sub>2</sub>, AA, Glu e Lat, consentono l'utilizzo di specifici sistemi biotelemetrici capaci di lavorare in ossidazione (Calia et al., 2009) o in riduzione (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009).



## 2. SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo del mio lavoro di tesi, consiste nel monitorare, tramite un sistema biotelemetrico impiantato in ratti freely-moving, la neurochimica cerebrale utilizzando microsensori e biosensori amperometrici.

Una volta sviluppate, le unità biotelemetriche impiantabili, sono state usate con successo in associazione con microsensori e biosensori per la lettura di O<sub>2</sub>, AA, Glu e Lat nello striato di ratti sottoposti a stress. L'analisi dei segnali derivati dai sensori sopra indicati, consente lo studio in tempo reale di pathway biochimici implicati nel metabolismo energetico cerebrale.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Hardware del sistema telemetrico.

Il circuito elettronico dell'apparecchio telemetrico impiantabile, mostrato in figura 1, è stato costruito utilizzando componenti a montaggio superficiale e consta di due parti diverse: il modulo amperometrico ed il modulo comprendente il microcontrollore ed il sistema ricetrasmittente.

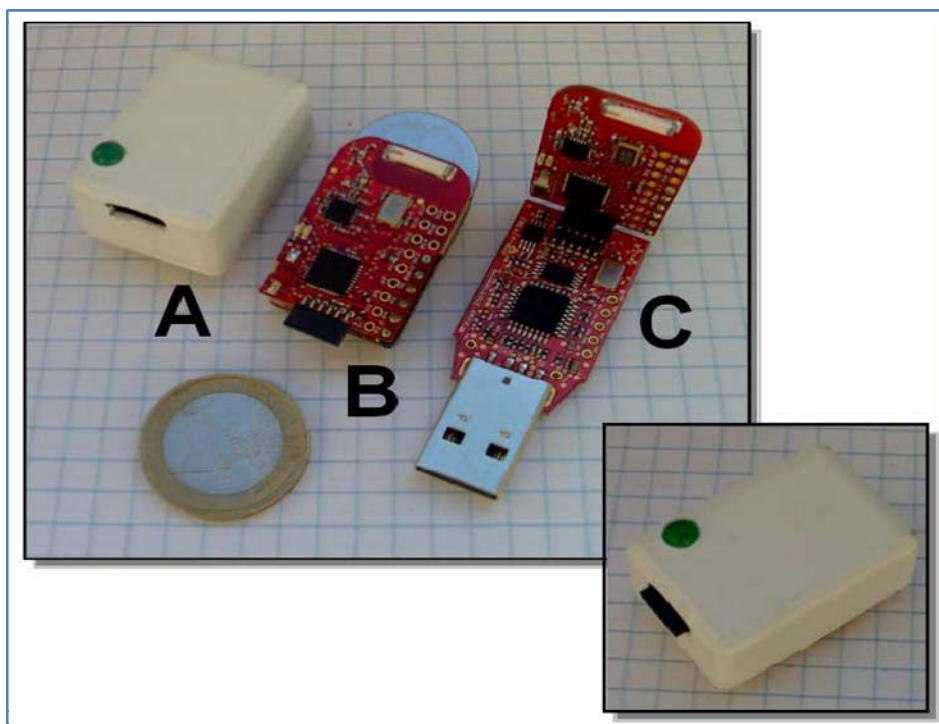


Fig.1. Il sistema biotelemetrico sviluppato durante lo studio di tesi.

Come schematizzato nelle figg. 2 e 3, il modulo amperometrico è stato realizzato utilizzando un amplificatore operazionale quadruplo (MPC6044) ad un diodo Zener (ZXRE4001), due resistenze, un potenziometro ed un condensatore su una piastra delle dimensioni di 28 mm x 17mm.

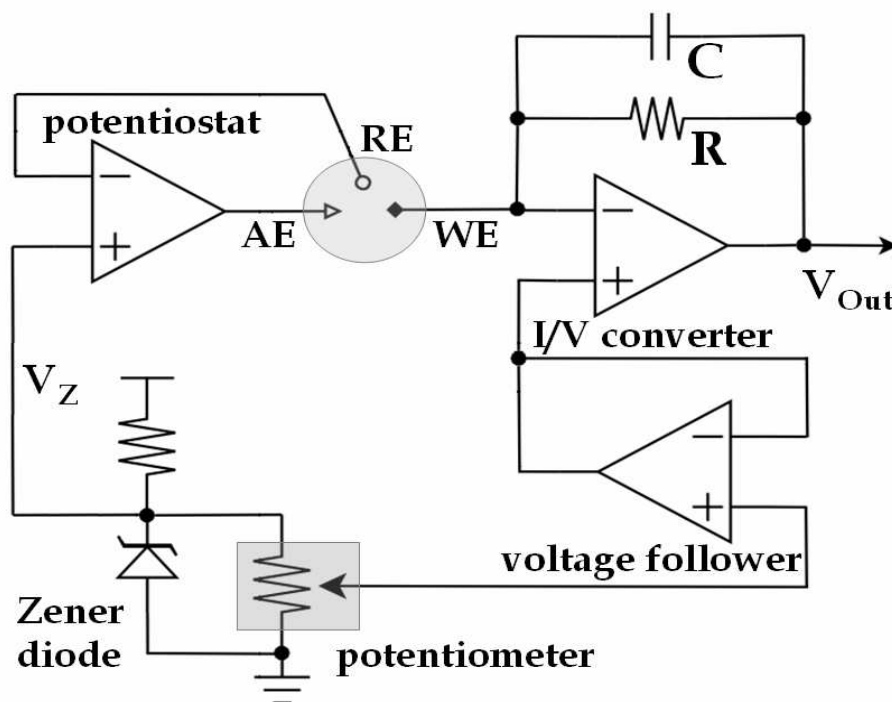


Fig. 2. Schema del modulo amperometrico del sistema biotelemetrico che lavora in riduzione, utilizzato per il monitoraggio in tempo reale delle variazioni di ossigeno striatale.



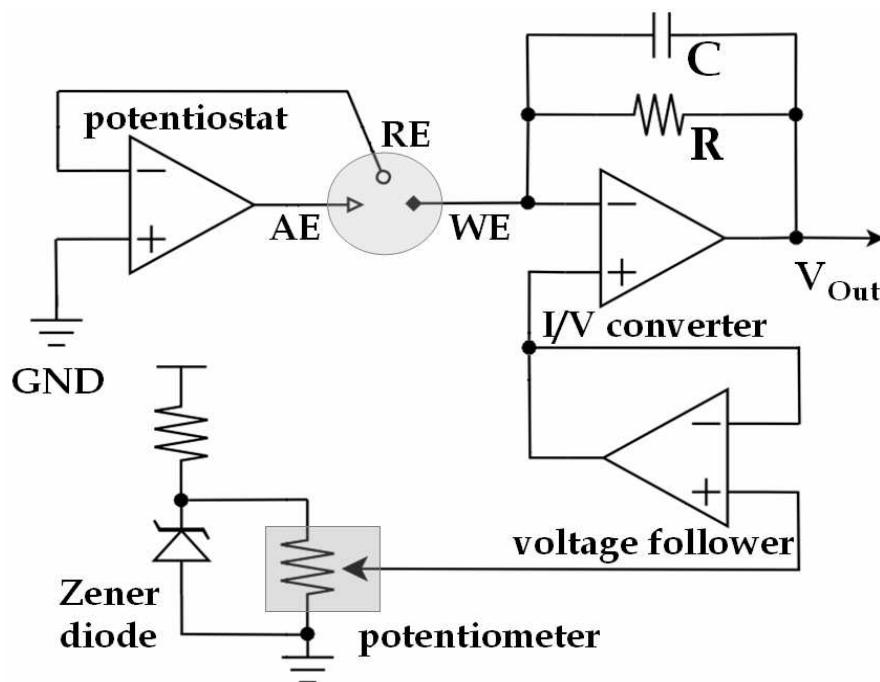


Fig. 3. Schema del modulo amperometrico del sistema biotelemetrico che lavora in ossidazione utilizzato in associazione con il micro sensore per l' AA ed i biosensori per il glutammato e lattato.

L'MCP6044 che può operare a singola alimentazione (“rail-to-rail” sia in ingresso che in uscita) è stato disegnato per applicazioni in micro potenza. Il consumo è di soli 600 nA per OPA garantendo una bassa corrente di polarizzazione (1 pA) ed una resistenza in ingresso estremamente alta ( $>10^{13} \Omega$ ).

Il diodo Zener gioca un ruolo cardine nella circuiteria amperometrica. Utilizzato come voltaggio di riferimento, lo Zener genera un voltaggio fisso  $V_z = 1.22 \text{ V}$  consumando circa  $10 \mu\text{A}$ , grazie ad una resistenza limite di 150 K posta tra l'alimentazione e lo Zener stesso. L'ingresso non invertente del potenziostato è stato connesso a

$V_z$  (Bazzu et al.,2009) per lavorare con un microsensore in riduzione, come per esempio, avviene con il microsensore per l'ossigeno (vedi fig.2).

Lavorando in ossidazione, l'input del potenziostato precedentemente indicato è stato collegato alla massa (GND) e dunque il potenziale applicato alla WE risulta essere positivo, sempre rispetto alla massa, con un range che va da GND a  $V_z$  (1.22V).

L'ingresso invertente del potenziostato è stato direttamente connesso allo RE mentre la sua uscita cablata direttamente all'elettrodo ausiliario. Questo permette l'implementazione del circuito di feedback in cui RE e AE sono mantenuti allo stesso potenziale che è lo stesso dell'ingresso non invertente (definito circuito potenziostatico). Il divisore di voltaggio bufferizzato, composto da un potenziometro e da un inseguitore di tensione, genera il potenziale necessario per polarizzare l'WE in un range compreso tra 0 e 1.22V ( $V_z$  controllato dallo Zener ZXRE4001).

Il convertitore corrente tensione (I/V) è un adattamento in singola alimentazione di un classico amplificatore in transimpedenza che deriva da un disegno precedentemente pubblicato (Serra et al., 2007; Rocchitta et al., 2007). La funzione di trasferimento corrente tensione è la seguente:

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

in cui  $I_{\text{redox}}$  è la corrente di ossidoriduzione che fluisce attraverso WE; R è la resistenza di feedback;  $V_{\text{App}}$  è il potenziale applicato all'WE (rispetto alla massa). Per esempio, lavorando in riduzione una corrente di 0  $\mu\text{A}$  corrisponde al potenziale applicato  $V_{\text{App}}$  (0.8, ossia - 0.4 V rispetto a  $V_z$ ) mentre con una corrente catodica di -30 nA,  $V_{\text{Out}}$  corrisponde a 0.5 V ( $R = 10 \text{ M}\Omega$ ). In queste condizioni la corrente massima consentita è circa -80 nA con un risultante  $V_{\text{Out}}$  di 0 V. Al contrario, quando il sistema è configurato in ossidazione, una corrente anodica massima di 18 nA può essere letta senza che il sistema vada in saturazione; in questo caso il potenziale applicato  $V_{\text{App}}$  è di 0.7 V con una uscita  $V_{\text{Out}}$  di 2.5 V ed una resistenza di 100  $\text{M}\Omega$ . La resistenza di feedback (R) ha un condensatore (C) che completa un filtro passa-basso (low-pass) in cui la resistenza di cut-off ( $F_{\text{cut-off}}$ ) è di 5Hz. Il valore di C è stato calcolato in Farad in accordo con l'equazione:

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

Una dummy cell è stata costruita in base a disegni precedenti pubblicati (Serra et al., 2007) per testare il modulo amperometrico della device biotelemetrica prima della calibrazione dei sensori. Lo scopo del disegno è stato quello di simulare una sorgente di corrente

di Thevenin che riproduce la risposta amperometrica costante di una cella elettrochimica reale. Il voltaggio applicato alla dummy cell è stato generato attraverso la connessione dell'WE e degli elettrodi di RE/AE ed è uguale alla differenza di potenziale tra i succitati elettrodi. Le correnti risultanti sono state convertite in un voltaggio di uscita ( $V_{Out}$ ) come è stato precedentemente illustrato. I dati ottenuti dalla calibrazione elettronica sono simili a quelli ottenuti negli studi precedenti (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009). L'integrato MSP430F2274 della Texas Instruments (TI) è il cuore del modulo digitale. Questo è un circuito integrato (IC) a 16 bit realizzato in complementary mos (CMOS) con caratteristiche di consumo di potenze ultra basse equipaggiato con convertitori analogici digitali (ADC) a 10 bit.

L'unità microcontrollore (MCU) realizza la conversione analogico digitale A/D dei segnali  $V_{Out}$ ,  $V_{Batt}$ ,  $V_{App}$  e legge la temperatura all'interno del chip utilizzando un riferimento interno di 2.5 V. Dopo il processo digitale del segnale (DSP) dei dati grezzi acquisiti, un pacchetto di dati seriale è stato generato e mandato al transceiver: il TI transceiver che è costituito da un CC2500 multi canale disegnato per applicazioni wireless a bassa potenza sulla banda di 2.4 GHz. Alcuni pin del microcontrollore sono stati connessi al

transceiver CC2500 e costituiscono la linea dati del transceiver stesso. In unione con il microprocessore (MCU) questo componente ibrido consente la realizzazione di un trasmettitore di dati seriali che lavora alla velocità di 9600 baud. Un'antenna chip miniaturizzata è stata integrata nella piastra PCB nella quale sono stati saldati tutti i componenti. Il bus ICSP, cioè quello che garantisce la programmazione seriale del circuito, consente di programmare il microprocessore (MCU) "on-board" in pochi secondi. Il modulo digitale (fig.1B e fig. 1C) è commercialmente disponibile pre-assemblato dalla TI (eZ430-RF2500). Una batteria "a bottone" Maxell ER2032 in litio da 3V, con una capacità di 210 mA/h, garantisce l'alimentazione all'unità biotelemetrica per una settimana in trasmissione continua alla frequenza di 1 Hz. Un piccolo contenitore plastico (3.2 x 2.1 x 1.4 mm; fig.1) completa il device impiantabile (fig. 1B, riquadro)

Il peso dell'unità impiantabile è di 12.4 g. inclusa la batteria (Fig.1, inserto). Un secondo modulo digitale (unità centrale, fig 1C) è connesso ad un personal computer (PC) attraverso un programmatore USB, ed ha il compito di accoppiare le unità biotelemetriche impiantabili con il software che gira su PC (Fig. 4).

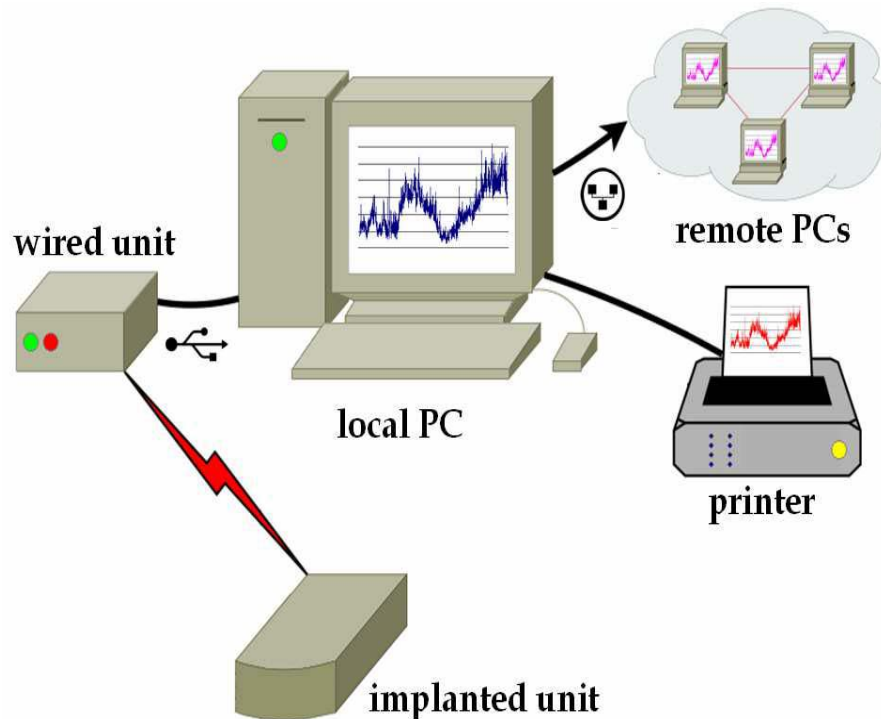


Fig. 4. Schema del sistema biotelemetrico, sviluppato e utilizzato in questo studio.

### 3.2 Firmware e software

Il firmware che pilota i microprocessori MSP430F2274 (unità periferica ed unità collegata all'USB del PC), è stato realizzato in linguaggio C utilizzando IAR Embedded Workbench nella versione 5.2 disponibile gratuitamente nel sito [www.ti.com](http://www.ti.com). Il programma, che gira nell'unità biotelemetrica impiantabile, consiste fundamentalmente di due routine: la routine principale e quella basata sul timer-interrupt che viene richiamata ogni secondo come illustrato nella figura 5.

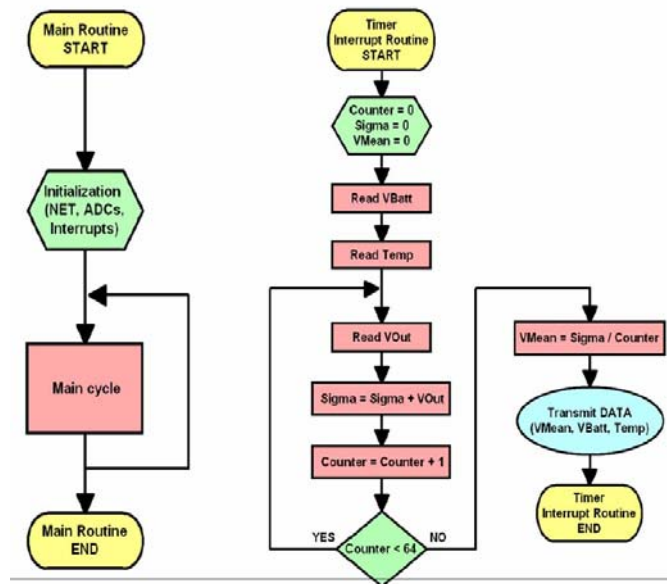


Fig. 5. Diagramma di flusso del firmware operante sull'unità impiantabile del sistema biotelemetrico.

Quando il segnale analogo  $V_{Out}$  è digitalizzato, la risoluzione di ADC (convertitore analogico digitale) viene incrementata da 10 bit utilizzando un metodo di sovracampionamento e decimazione (Pagnacco et al. 1997):

$$F_{os} = 4w \cdot F_s \quad (11)$$

in cui  $w$  è il numero di bit addizionali di risoluzione (2);  $F_s$  la frequenza di campionamento (1Hz);  $F_{os}$  la frequenza di sovracampionamento. In accordo con il teorema di Nyquist,  $F_s$  può essere calcolato come segue:

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

in cui  $F_{max}$  è stata fissata a 2 Hz. Per fare questo il microprocessore MCU acquisisce ed accumula 64 campioni consecutivi e divide il

risultato per  $2^6$  (Fig. 5). Questa tecnica ha consentito di aumentare la risoluzione dei convertitori analogico digitali (ADC) da 10 a 12 bit. I dati trasmessi in radiofrequenza (RF, 1 al secondo), sono stati incapsulati in un protocollo di trasmissione (SimpliciTI™), implementato dalla Texas Instruments per lo sviluppo di reti wireless (NETs) di bassa potenza. Fino a 100 unità impiantabili, ognuna delle quali ha un indirizzo di 8 bit memorizzabili all'interno della memoria E<sup>2</sup>PROM, possono condividere lo stesso canale di trasmissione. La routine interrupt-driven del ricevitore, monta un secondo microprocessore MSP430F2274, comunica con un PC usando una porta USB e filtra i dati sia in ingresso che in uscita (IN-OUT). Il firmware è stato trasferito ai due microcontrollori utilizzando un programma USB della TI collegato al bus ICSP (Fig. 6).



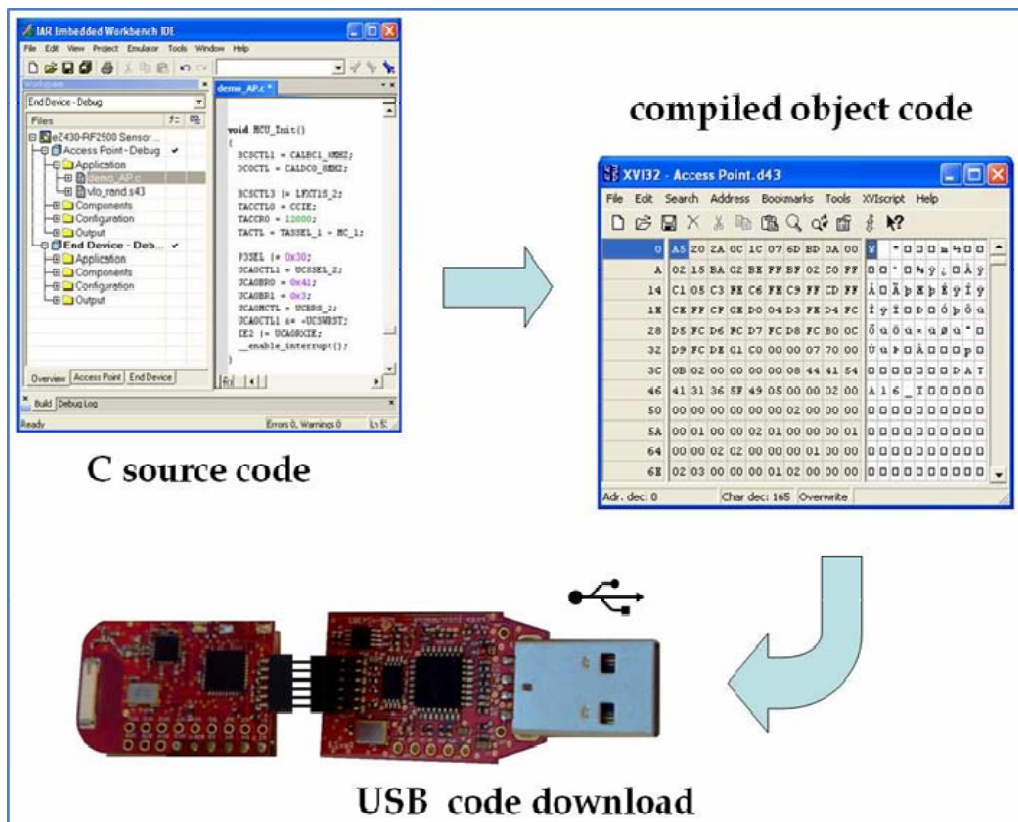


Fig. 6. Programma process di MSP430F2274 che consiste in un ciclo “edit-compile-download”.

Il software che gira nel PC sotto windows XP Professional™ o Vista™, comunica attraverso la USB usando un driver a basso livello reso disponibile liberamente nel sito [www.ti.com](http://www.ti.com). L’interfaccia grafica (Fig. 7) è stata sviluppata utilizzando il software Profilab Expert® (versione 4.0 da Abacom) mentre le librerie a link dinamico (DLL) all’interno delle quali ci sono le routine di serial-data-parser sono state programmate in C utilizzando il compilatore DEV-C++ versione 4.9.9.2.

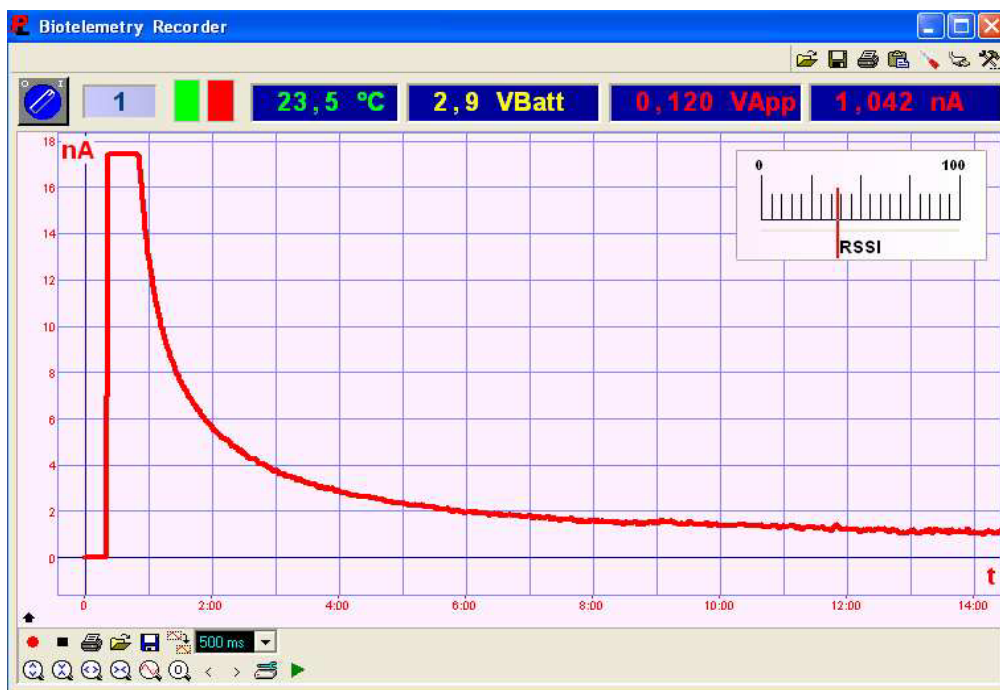


Fig. 7. Interfaccia grafica del software per l'acquisizione dei dati.

L'applicazione (capace di plottare, memorizzare e mostrare i dati), permette l'interfaciamento del sistema con la stampante attraverso la porta USB, con una LAN (Local Area Network) o tramite internet via TCP/IP (Fig. 4). Un allarme viene generato dal software quando il voltaggio della batteria scende al di sotto dei 2.7 V ( $V_{\text{Batt}} < 2.7$ ), quando la potenza del segnale di trasmissione RSSI è troppo bassa oppure non c'è più la trasmissione di dati legata ad un'eccessiva distanza dell'unità periferica rispetto all'unità centrale.

### 3.3 Sensore di movimento

Il sensore di movimento/vibrazione (fig. 8) è costituito da un interruttore di micro-vibrazioni (mod. MVS060802, Sensolute™,

Karlsruhe, Germania) che viene attivato durante le vibrazioni emesse dai movimenti di una sferetta d'oro di 8 mm inclusa all'interno di un cilindro d'oro quando viene impressa una accelerazione inerziale di oltre 50 mg. Il sensore è collegato ad una resistenza di pull-up, posta all'interno del micro controller, tramite un pin di input. Il numero delle transizioni digitali del pin vengono registrate ed inviate ogni secondo per via telemetrica.

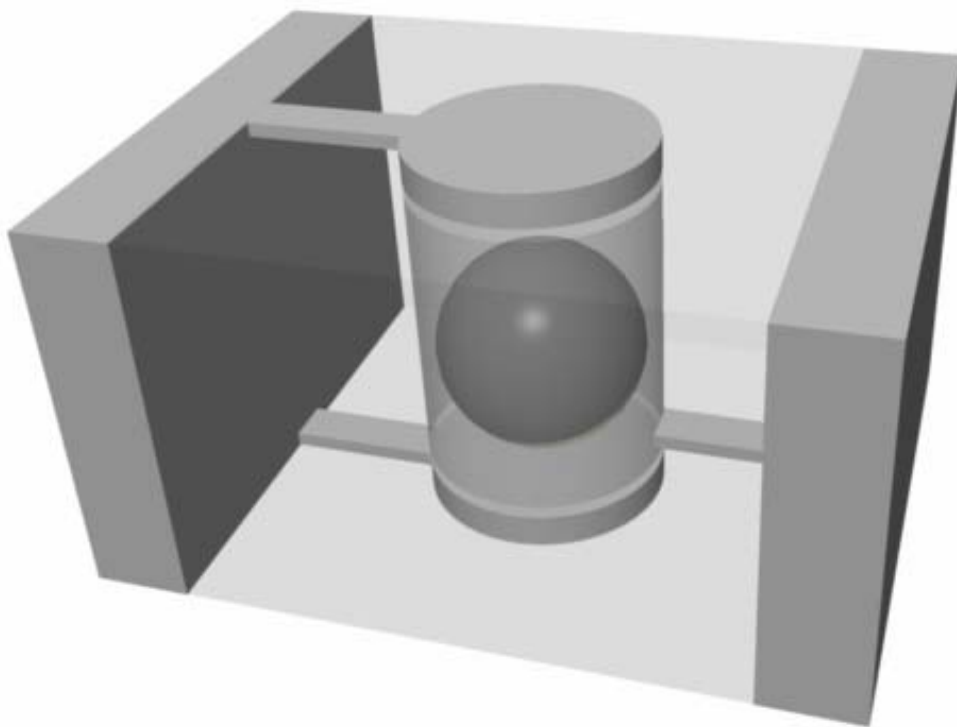


Fig.8. Rappresentazione in 3D del sensore di movimento usato in questo studio

### **3.4 Reagenti e soluzioni**

Tutte le sostanze chimiche usate presentavano un alto grado di purezza; Tutti i reagenti chimici utilizzati sono stati sciolti in acqua bidistillata deionizzata (Milli-Q). La glucosio ossidasi (GOx) di *Aspergillus niger* (EC 1.1.3.4.), lattato ossidasi (LOx) di *Pediococcus species* (EC 1.1.3.2.), o-fenilendiamina (o- PD), d(+)-glucosio e L-lattato, nitrocellulosa (NC), poliuretano (PU), polietilenimmina (PEI), sono stati acquistati dalla Sigma Chemicals (Milano, Italy). Le soluzioni concentrate di glucosio (1 M) sono state preparate in acqua e lasciate stabilizzare per 24 h ed utilizzate dopo aver raggiunto l'equilibrio tra le due forme anomeriche; le soluzioni sono state usate per la calibrazione dopo 24h. La soluzione concentrata di lattato (1 M) è stata preparata in acqua e lasciata in frigorifero (4 °C). La soluzione di tampone fosfato (PBS) è stata preparata usando NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8.1 mM), e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.47 mM) della Sigma, in seguito corretta ad un pH 7.4. Le soluzioni degli enzimi sono state preparate sciogliendo 850 unità di GOx o 50 unità di LOx in 50µl di PBS e tenute ad una temperatura di 4 °C. La soluzione di polietilenimmina all'1% è stata ottenuta sciogliendo la sostanza in acqua. Il poliuretano è stato sciolto in tetraidrofurano per ottenere una soluzione al 5%. La polvere monomerica di o-PD è stata disciolta in

PBS degasato immediatamente prima dell'elettrosintesi voltammetrica del polimero (poly-o-PD, PPD) sulla superficie dell'elettrodo di platino. La nitrocellulosa al 4% è stata sciolta in etanolo/dietiletere.

### **3.5 Microsensore per l'ossigeno**

La costruzione del microsensore per l'ossigeno e la sua calibrazione è stata realizzata come descritto in precedenza (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009 ). In breve, un filo di argento lungo 1mm ( $\emptyset = 125 \mu\text{m}$ , Advent Reserarch Materials, Suffolk, UK) è stato introdotto in un capillare di vetro (10 mm di lunghezza; I.D.  $\emptyset = 180 \mu\text{m}$  Polymicro Technologies, Phoenix, USA), quest'ultimo è stato parzialmente riempito con colla epossidica caricata al carbone (EC) ottenuta miscelando 450 mg di grafite con 350 mg di resina (Araldite-M<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, Milano, Italia). L'elettrodo è risultato essere costituito da un disco di EC del diametro di 180  $\mu\text{m}$ . Una volta costruito è stato messo in stufa a 60° C per 12 ore. Una forma conica del microsensore è stata alla fine ottenuta mediante l'uso di un trapanino elettrico (Dremel).

I microsensori finali per la detection dell'ossigeno (Fig. 9) hanno una lunghezza di circa 250 $\mu\text{m}$  ed una superficie di 0.00145  $\text{cm}^2$  con una punta inferiore a 25 $\mu\text{m}$ . Un trattamento con nitrocellulosa

(NC, collodio) è stato realizzato attraverso l'immersione dei sensori in una soluzione di collodio (4% nitrocellulosa in etanolo/dietiletere) per tre volte. Dopo ogni immersione, il sensore veniva lasciato asciugare a 40 °C per un'ora. La membrana di nitrocellulosa, in quanto altamente idrofobica, costituisce una barriera per grandi molecole organiche come le proteine, impedendo alla superficie di sporcarsi. Tale barriera può essere attraversata facilmente da piccole molecole come gli ioni o i gas (Bazzu et al., 2009).

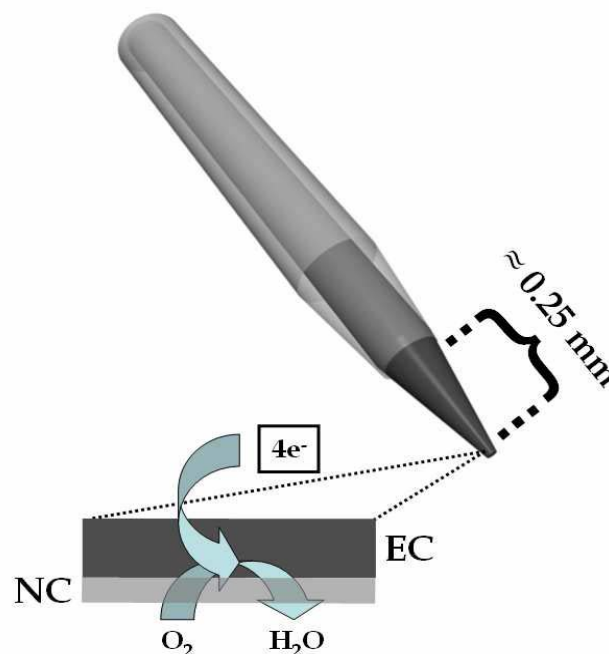


Fig. 9. Rappresentazione schematica del microsensore per l'ossigeno usato nel mio studio.

Il potenziale di riduzione per l'ossigeno, su una superficie di EC, è stato determinato sperimentalmente in uno studio precedente

(Bazzu et al., 2009) utilizzando la voltammetria ciclica e fissato a -400mV rispetto ad un elettrodo di riferimento in Ag/AgCl. Per gli esperimenti e le calibrazioni *in-vitro* ed *in-vivo*, è stata usata la tecnica voltammetrica CPA (Amperometria a Potenziale Costante). Non sono state identificate interferenze significative esponendo i sensori ad altre molecole elettroattive (AA, UA, DA, DOPAC e HVA) presenti nel fluido extracellulare dello striato anche a concentrazioni elevate (Calia et al., 2009 ). Il microsensore per l'ossigeno è stato calibrato aggiungendo volumi noti di soluzioni standard di O<sub>2</sub> al 100% a PBS precedentemente degasato con azoto. Sono stati scelti solamente i sensori con una sensibilità inferiori a 10 µM. Tutte le calibrazioni *in-vitro* del microsensore per l' O<sub>2</sub> sono state realizzate 24 ore dopo la loro costruzione e immediatamente prima dell'impianto *in-vivo* utilizzando la cella elettrochimica illustrata nei precedenti lavori (Serra et al., 2007; Rocchitta et al., 2007) e modificata in modo specifico per l'ossigeno (Bazzu et al., 2009). Le calibrazioni (Fig. 10) hanno mostrato una buona linearità con uno slope di  $- 254 \pm 32 \text{ pA } \mu\text{M}^{-1}$  di ossigeno ( $r^2 = 0.999$ ;  $n = 6$ ), in accordo con le precedenti osservazioni (Calia et al., 2009 ).

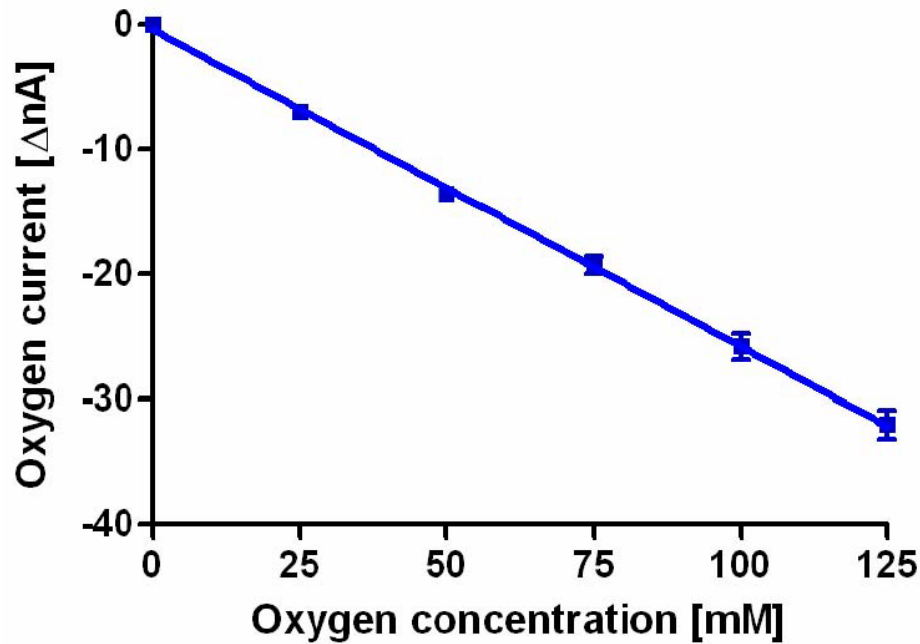


Fig. 10. Calibrazione *in-vitro* del microsensore per l'ossigeno.

### 3.6 Microsensore per l'acido ascorbico

I microsensori per l'acido ascorbico (Fig. 11) sono stati costruiti sull'impronta dei sensori per l'ossigeno. A questi microsensori viene applicato un potenziale di + 120 mV verso un RE Ag/AgCl.

Le calibrazioni *in-vitro* del microsensore per l' AA sono state realizzate ad una temperatura di 25 °C in PBS fresco immediatamente prima dell'impianto. Il potenziale di + 120 mV è stato applicato all'elettrodo di lavoro WE. Dopo aver raggiunto una linea di base stabile si è proseguito con la calibrazione: concentrazioni note di AA sono state aggiunte al PBS fresco, in un range che andava da 0 a 5 mM. I microsensori calibrati prima dell'impianto (Fig. 12), hanno



mostrato una buona sensibilità e linearità ( $2.96 \text{ nA} \pm 0.1 \text{ mM}$ ,  $r^2 = 0.998$ ,  $n = 6$ ).

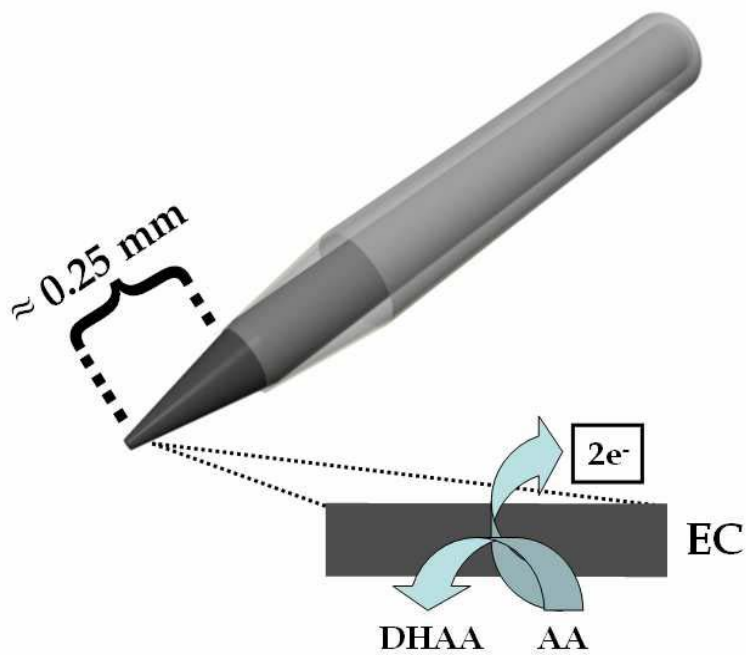


Fig. 11. Rappresentazione schematica del microsensore per l'acido ascorbico usato nello studio.

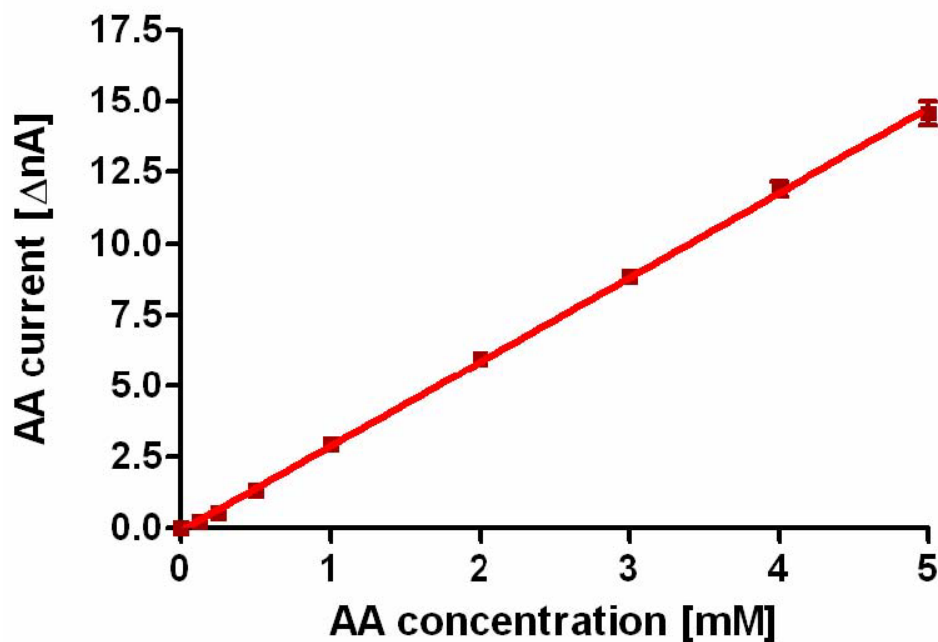


Fig. 12. Calibrazione *in-vitro* del microsensore per l'acido ascorbico.

### 3.7 Biosensore per il glucosio

Il disegno del biosensore per il glucosio (Fig. 13) è stato descritto in dettaglio in una precedente pubblicazione (Serra et al., 2007). In breve, un cilindro di platino della lunghezza di 1 mm ottenuto tagliando un filo di platino isolato con teflon ( $\varnothing = 125\mu\text{m}$ , Advent Research Materials, Suffolk, UK), è stato immerso per cinque minuti in una soluzione di glucosio ossidasi (GOx) per consentirne l'adsorbimento. Dopo dieci minuti a temperatura ambiente, per permettere al solvente di evaporare, il biosensore è stato posto in un becker riempito con PBS degasato e contenente o-fenilenediammina (OPD, 250 mM) in forma monometrica. L'elettrosintesi della poli-o-

fenilenediammina (p-OPD) è stata realizzata applicando un potenziale di + 700 mV contro un RE Ag/AgCl per quindici minuti. Dopo l'elettropolimerizzazione il biosensore è stato conservato alla temperatura di + 4 °C.

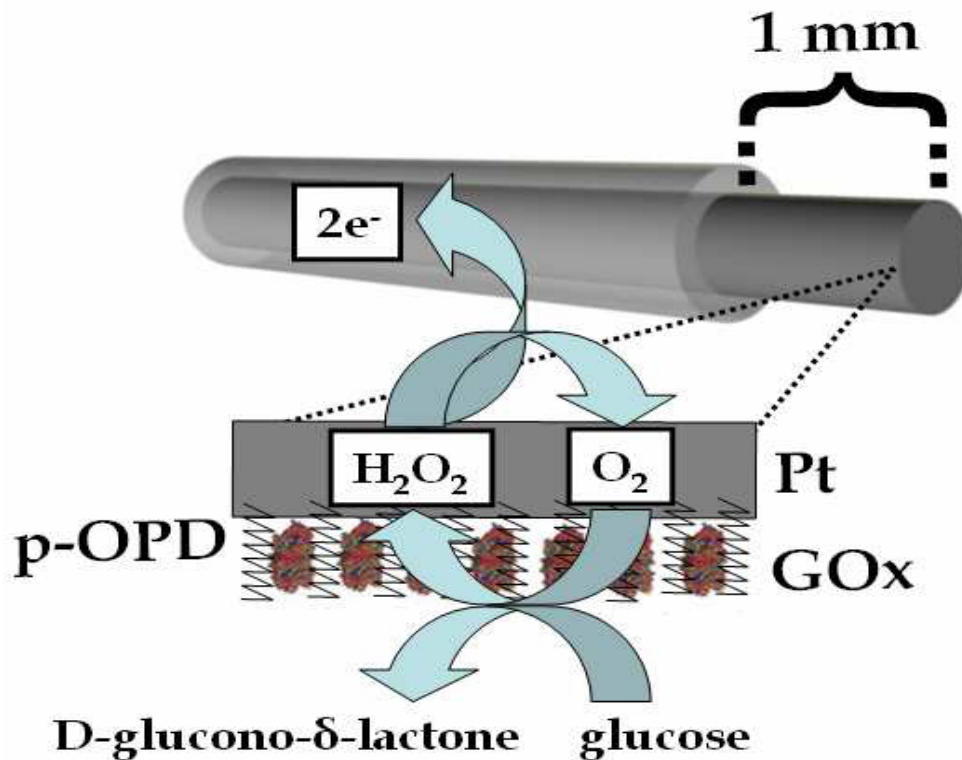


Fig. 13. Rappresentazione schematica del biosensore per il glucosio usato nel presente studio.

Le calibrazioni *in-vitro* del biosensore per il glucosio sono state realizzate in PBS in cui è stata fatta gorgogliare dell'aria per 30', attraverso una successione di dieci iniezioni di glucosio (0.2, 0.4, 0.6, 1, 2, 10, 20, 60, 100, 140 mM). I dati della calibrazione (Fig. 14) sono in accordo con l'equazione di Michaelis-Menten ( $r^2 = 0.984$ ,  $n = 6$ )

con una  $V_{MAX}$  pari a  $59 \pm 0.6 \text{ nA}$  ed una  $K_M$  di  $5.6 \pm 0.4 \text{ mM}$ . La risposta del biosensore alle basse concentrazioni di glucosio (0-2 mM; Fig. 14), rivela un'eccellente linearità ( $r^2 = 0.999$ ,  $n = 6$ ) ed uno slope di  $8.9 \pm 0.08 \text{ nA mM}^{-1}$ .

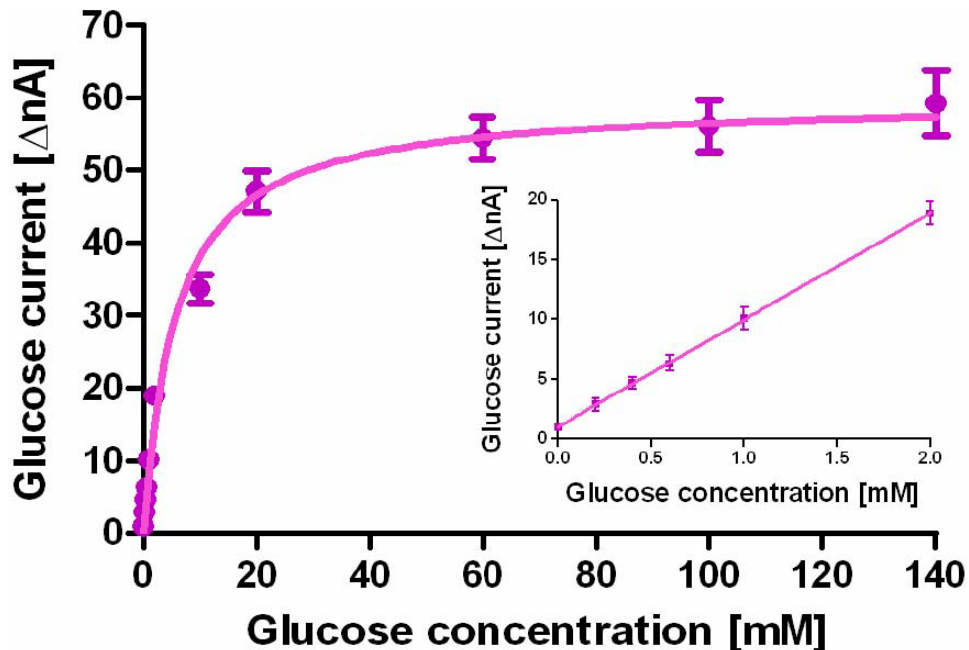


Fig. 14. Calibrazione *in-vitro* del biosensore per il glucosio.

### 3.8 Biosensore per il lattato

La costruzione dei biosensori per il lattato (fig. 15) è stata realizzata sulle basi di una procedura precedentemente descritta in letteratura ed utilizzata per creare biosensori per il glutammato (McMahon et al., 2006). Un cilindro di platino (1 mm) è stato immerso in una cella elettrochimica contenente PBS (degasato con azoto) ed il monomero OPD, come descritto per il biosensore per il

glucosio. Il cilindro Pt/p-OPD è stato rapidamente: immerso e ritratto (quick dip), in una soluzione di polietilenimmina (PEI, 0.5% in acqua) e LOx (25 U/50 µl PBS) per consentire l'adsorbimento dell'enzima sulla superficie del platino. Dopo cinque minuti a temperatura ambiente, il processo di quick dip è stato ripetuto per altre quattro volte. Con lo scopo di aumentare la  $K_M$  del biosensore, è stata applicata una membrana che riduceva la diffusione del substrato (Schuvailo et al., 2006). Tale membrana è stata ottenuta immergendo lentamente il sensore [Pt/(PEI+LOx)] in una soluzione di poliuretano (PU 2,5% in tetraidrofurano). In fine, il biosensore è stato conservato in frigorifero fino all'utilizzo.

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

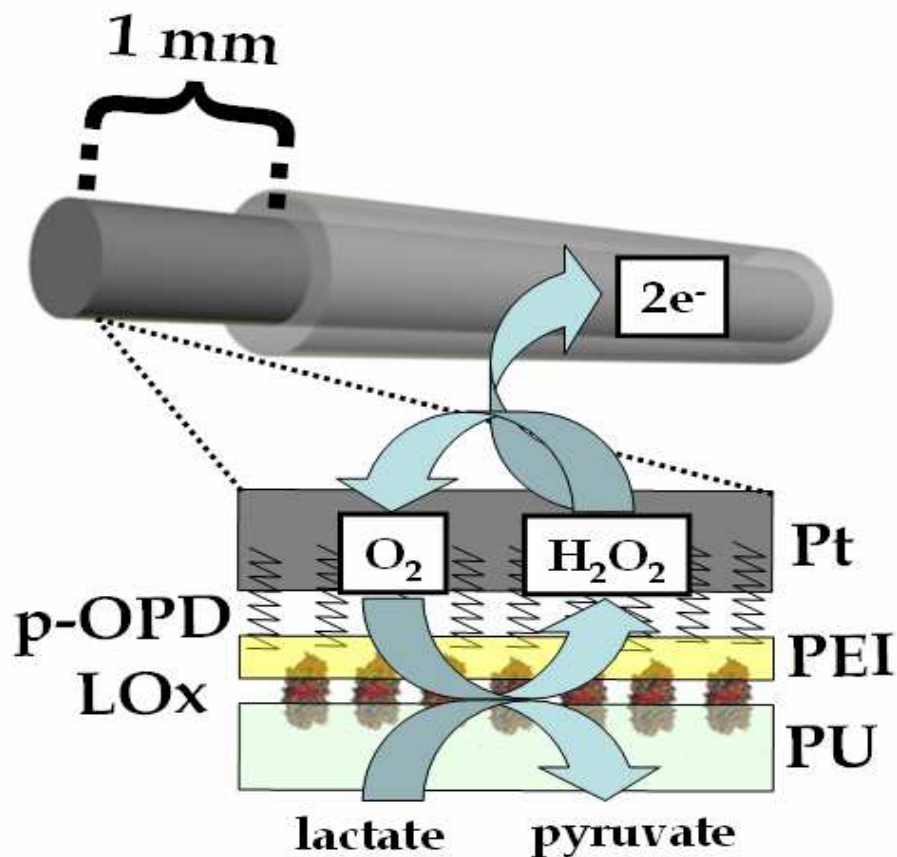


Fig. 15. Rappresentazione schematica del biosensore per il lattato usato nella presente ricerca.

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

Le calibrazioni hanno mostrato una cinetica corrispondente alla classica equazione di Michaelis-Menten ( $r^2 = 0.944$ ,  $n = 6$ ) con una  $V_{MAX}$  e  $K_M$  corrispondenti rispettivamente a  $92,8 \pm 2$  nA e  $8.7 \pm 0.9$  mM (Fig. 16). La regione lineare, valutata alle basse concentrazioni

(0-5 mM), è risultata essere buona ( $r^2 = 0.997$ ,  $n = 6$ ) ed uno slope di  $6.7 \pm 0.2 \text{ nA mM}^{-1}$ (Fig. 16).

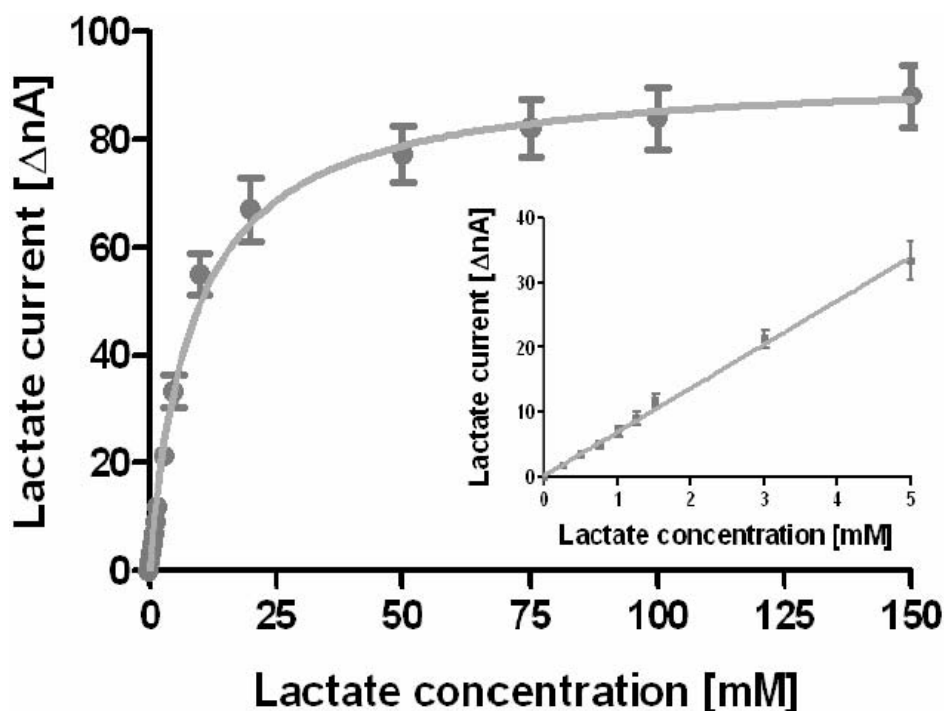


Fig.16. Calibrazione *in-vitro* del biosensore per il lattato.

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

### 3.9 Animali

Per tutti gli esperimenti sono stati usati ratti maschi Wistar (Morini R. Emilia, Italia), dal peso di 250-350 g. Gli animali sono stati

mantenuti in condizioni standard di luce (rispettando il ciclo circadiano 12 ore di luce e 12 ore di buio) e di temperatura (21 °C) con acqua e cibo *ad libitum*.

Tutte le procedure sono state consentite dalla Comunità Europea della direttiva 86/609 inclusa nel decreto No. 116/1992 del Ministero Italiano della Sanità Pubblica.

### **3.10 Chirurgia stereotassica**

La chirurgia stereotassica è stata realizzata sotto anestesia in cloralio idrato (400 mg Kg<sup>-1</sup>) e la temperatura corporea dell'animale, durante l'intervento, è stata mantenuta a 37 °C utilizzando un tappetino isotermico.

La salute degli animali è stata controllata prima di ciascun intervento, in accordo con le linee guida pubblicate (Wolfensohn e Loyd, 2003).

I microsensori per l'ossigeno e l'acido ascorbico, i biosensori per il glucosio ed il lattato sono stati impiantati nello striato di destra (Fig. 17) utilizzando le seguenti coordinate stereotassiche dell'atlante di Paxinos & Watson (Paxinos & Watson, 2007): A/P + 0.5 dal bregma, + 2.5 M/L e - 4.0 D/V dalla dura madre. Gli elettrodi ausiliario e riferimento sono stati impiantati nella corteccia parietale.



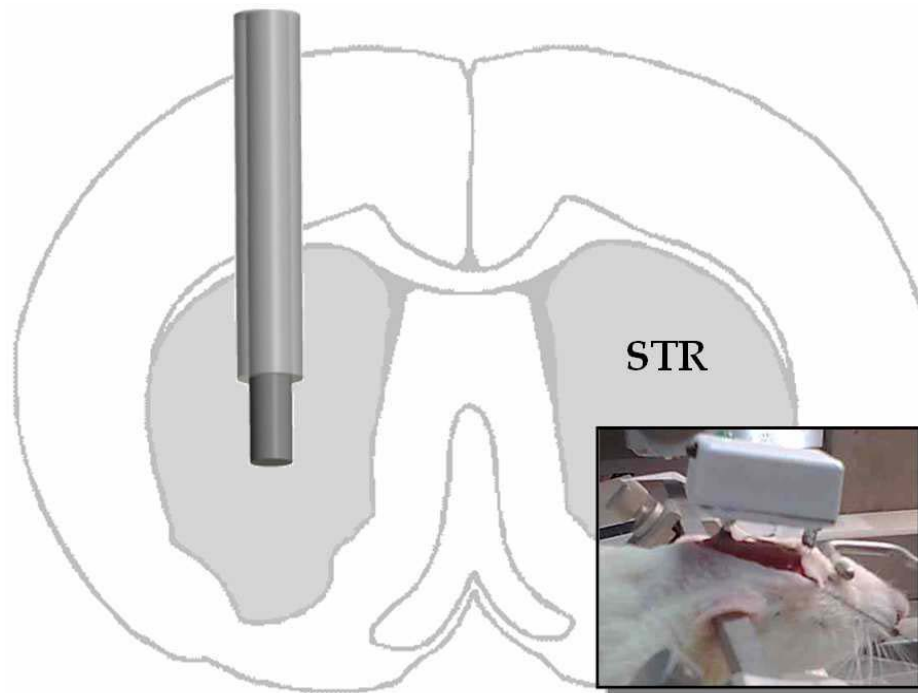


Fig.17. Inserimento del sensore amperometrico nello striato di destra, tramite chirurgia stereotassica. Nell'insero, si può vedere l'unità biotelemetrica impiantata e fissata al tavolato cranico dell'animale.

L'unità biotelemetrica è stata fissata grazie a due viti inserite nel tavolato cranico (Fig. 16) come descritto in precedenza (Bazzu et al., 2009).

A seguito della chirurgia gli animali sono stati sistemati in cilindri di plexiglas ( $\varnothing = 45$  cm) e mantenuti in condizioni di luce e di temperatura controllate, con libero accesso a cibo ed acqua. I sensori sono stati polarizzati 24 ore dopo l'impianto. Il monitoraggio delle specie neurochimiche di interesse aveva inizio dal momento in cui i

sensori venivano connessi e durante il libero movimento del ratto all'interno del bowl (freely moving: Fig. 18).



Fig. 18. Device biotelemetrico impiantato in un ratto freely moving.

### **3.11 Istologia**

Dopo ciascun esperimento i ratti sono stati sacrificati con un'iniezione di cloralio idrato ( $800 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). La localizzazione di ciascun sensore è stata stabilita dalla istologia *post-mortem*. I cervelli sono stati fissati in formalina e sezionati (tagli coronali da  $50 \mu\text{m}$ ) con un criostato. Le fettine sono state colorate con cresil violetto ed esaminate al microscopio.

### 3.12 Analisi statistica

Le concentrazioni di O<sub>2</sub> sono state espresse in μM, mentre l'AA, il glucosio ed il lattato in mM. I segnali dell' O<sub>2</sub>, dell'ascorbato e del perossido d'idrogeno sono stati espressi in nA come dati ottenuti a seguito della sottrazione della linea di base ( $\Delta nA$ ). La risposta *in-vitro* dei sensori è stata caratterizzata immediatamente prima dell'impianto ed i parametri elettrochimici valutati prima degli esperimenti *in-vivo*. Le variazioni delle molecole, nel tessuto cerebrale (*in-vivo*), sono state calcolate come variazioni assolute contro le corrispondenti linee di base e le loro concentrazioni striatali sono state stimate utilizzando le calibrazioni *in-vitro* realizzate prima dell'impianto.

La significatività statistica delle variazioni, è stata calcolata utilizzando il paired t-test tra le medie di 300 dati consecutivi acquisiti prima (linea di base) e durante la massima escursione delle variazioni neurochimiche come risultato della stimolazione fisiologica (tail pinch).

Il coefficiente di correlazione di Pearson è stato usato per mostrare la significativa correlazione delle variazioni di correnti indotte dai tail pinch tra l' O<sub>2</sub>, AA, glucosio e lattato. Immediatamente dopo l'applicazione dello stimolo, i primi cinque minuti di dati grezzi

corrispondenti a 300 punti ( $n = 300$ ) sono stati comparati punto per punto. L'ipotesi nulla è stata significativa quando  $p < 0.05$



## 4. RISULTATI

Le registrazioni delle linee di base e della stimolazione fisiologica sono state realizzate nel primo giorno dopo la chirurgia stereotassica, a partire dalle 24 ore dall'impianto dei sensori.

### 4.1 Ossigeno striatale

Il microsensore per l'O<sub>2</sub> raggiunse una linea di base stabile ( $24.3 \pm 2.7$  nA) dopo un periodo di circa cinquanta minuti dall'applicazione del potenziale all'WE. Considerando che la corrente di background del microsensore in PBS era di  $-14.2 \pm 0.9$  nA, è possibile stimare la concentrazione di ossigeno usando le pre-calibrazioni *in vitro*. La concentrazione è risultata essere pari a  $39 \pm 7.1$  μM di ossigeno, un valore in accordo con i risultati precedenti (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009). La stimolazione fisiologica, ottenuta con un tail pinch di cinque minuti (Fig. 19), è stata realizzata con lo scopo di aumentare l'attività neuronale e promuovere l'aumento del flusso ematico cerebrale neuronale regionale (rCBF). Il risultato è stato: un aumento dell'attività motoria dell'animale con una riduzione della corrente legata all'ossigeno striatale di  $-2.7$  nA, corrispondente a  $+11.69$  μM, dati statisticamente differenti dalla linea di base precedentemente registrata ( $p < 0.001$ ; Fig. 19).

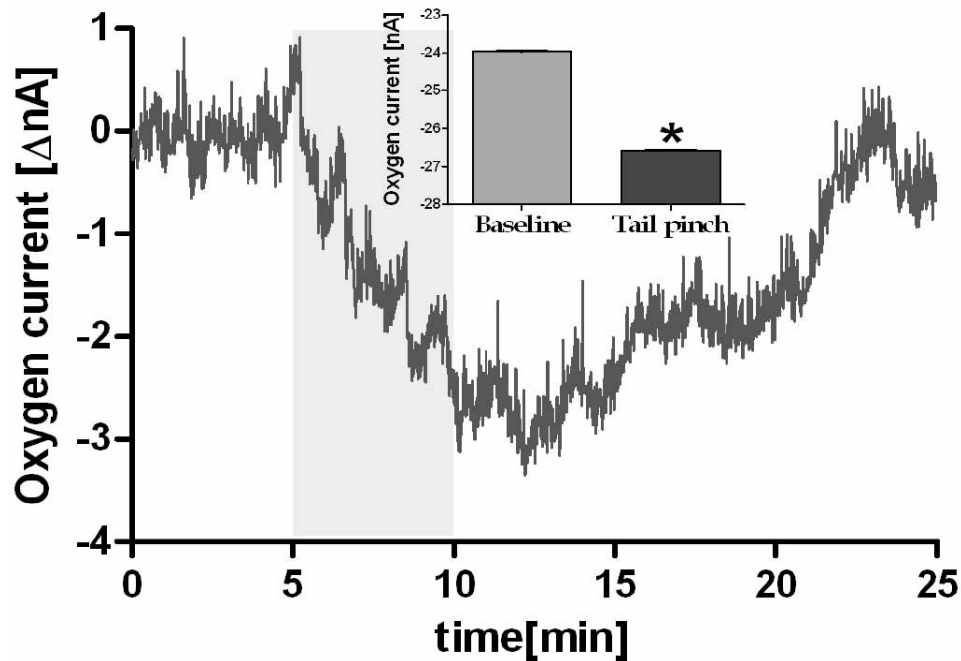


Fig.19. Effetto della stimolazione fisiologica (5 min. tail pinch, banda verticale) sull'ossigeno disciolto nello striato.

Le dinamiche dell'ossigeno striatale a seguito di stimolazioni fisiologiche, hanno dato come risultato un aumento delle concentrazioni di  $O_2$  per lo più legato ad un aumento del flusso ematico distrettuale durante l'attivazione neuronale, questo in accordo con i dati ottenuti in precedenza (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009).

#### 4.2 Acido ascorbico striatale

Una linea di base stabile per l'AA è stata raggiunta dopo un periodo di circa venticinque minuti dall'attivazione del sensore. La linea di base calcolata per l'ascorbato corrispondeva ad una

concentrazione di 566  $\mu\text{M}$ , in linea con i precedenti risultati (Calia et al., 2009). Un aumento fisiologico ( $p < 0.001$ ; Fig. 19) della corrente di acido ascorbico striatale (+ 0.447 nA corrisponde a + 228  $\mu\text{M}$ ) è stata osservata immediatamente dopo la somministrazione del tail pinch di cinque minuti. (Fig. 20).

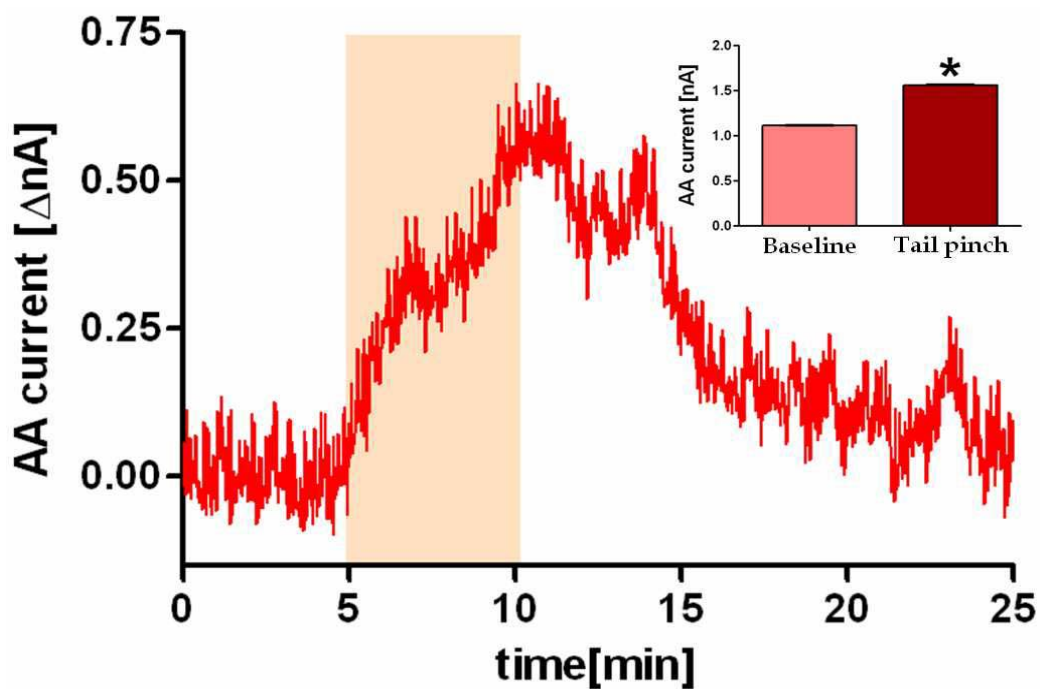


Fig. 20. Effetto dei 5 min. di tail pinch (banda verticale) sull' acido ascorbico striatale.

Questo risultato (aumento di AA dopo attivazione neuronale) è in accordo con l'attivazione di un eteroscambio (antiporto) AA/glutammato (Rice, 2000) in cui l'AA viene rilasciato a seguito di un rilascio di glutammato il quale, a sua volta, viene scambiato (in



particolare negli astrociti) con l'AA con un conseguente aumento di quest'ultimo nello spazio extracellulare (Miele et al., 2000).

### 4.3 Glucosio striatale

Gli esperimenti *in-vivo* concernenti i biosensori per il glucosio, sono stati realizzati utilizzando le procedure indicate per i sensori dell'O<sub>2</sub> e dell'AA. Mezz'ora dopo l'attivazione del biosensore, è stata raggiunta una linea di base stabile corrispondente a  $4.6 \pm 0.2$  nA ( $517 \pm 26$   $\mu$ M di glucosio extracellulare striatale). La stimolazione fisiologica (Fig. 21) ha indotto una diminuzione significativa del glucosio ( $-167$   $\mu$ M; Fig. 21), seguito da un aumento, rispetto alla linea di base, dopo la sospensione dello stimolo.

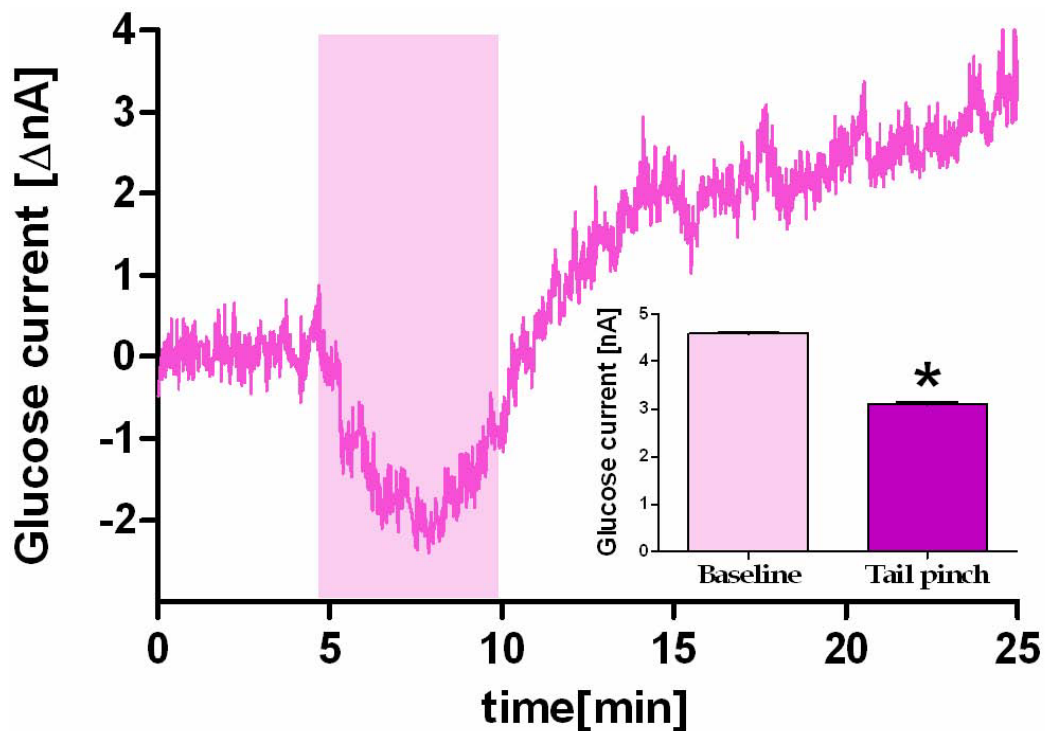


Fig.21. Effetto dei 5 min. di tail pinch (banda verticale) sul glucosio striatale.

#### 4.4 Lattato striatale

Quaranta minuti dopo la polarizzazione del biosensore per il lattato, è stata raggiunta una linea di base stabile corrispondente a  $5.09 \pm 0.43$  nA ( $759 \pm 62$   $\mu$ M utilizzando la calibrazione *in-vitro*). Un tail pinch, della durata di cinque minuti (Fig. 22), ha prodotto un aumento significativo del segnale per il lattato durante la stimolazione e dopo la sospensione dello stimolo ( $+544$   $\mu$ M,  $p < 0.001$ ; Fig. 22).

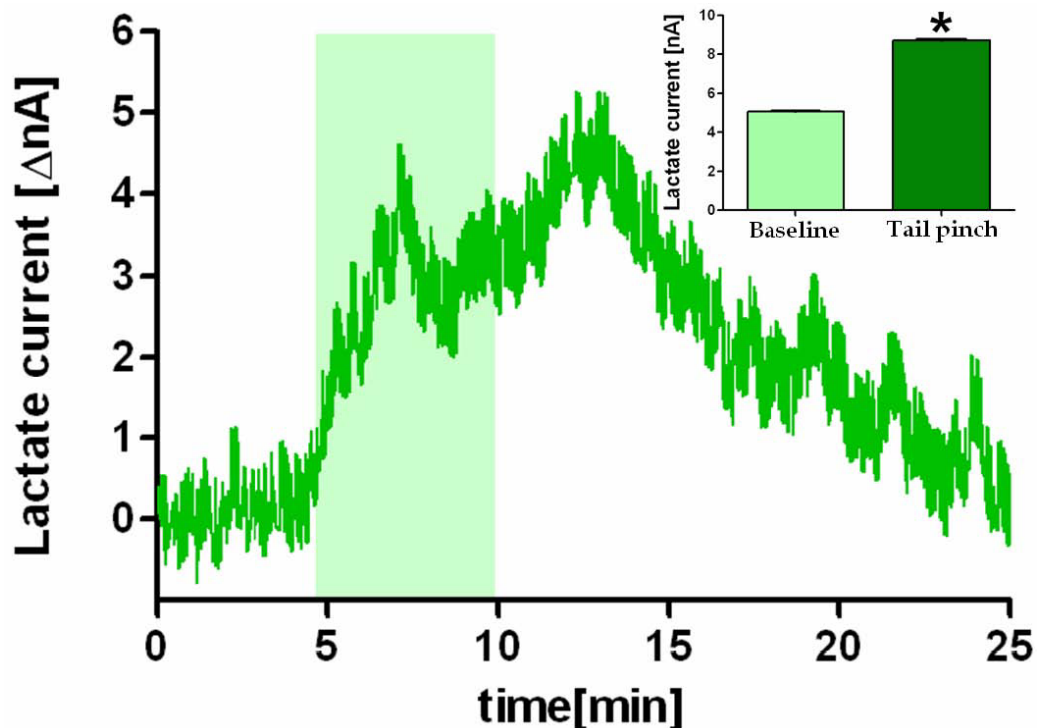


Fig.22. Effetto dei 5 min. di tail pinch (banda verticale) sul Lattato striatale.

#### 4.5 Il movimento durante l'attivazione neuronale

La somministrazione del tail pinch ha prodotto un aumento del numero delle vibrazioni e dei micromovimenti nel sensore inerziale in funzione dell'incremento nell'attività motoria dell'animale. Al termine della stimolazione fisiologica, l'animale ha ridotto i movimenti portando il tracciato ai livelli di base registrati prima del tail pinch. Alla fine dell'esperimento (dopo circa 3 ore), la linea del tracciato era posizionata su livelli nettamente inferiori rispetto a quelli iniziali (fig. 23).

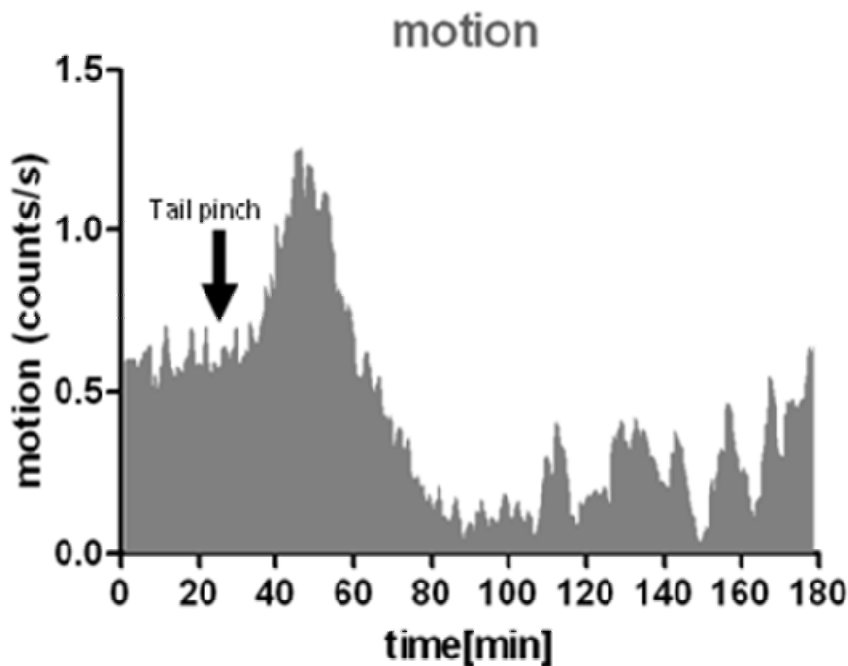


Fig.23. Detection del movimento prima, durante e dopo l'attivazione neuronale indotta da un tail pinch della durata di 5'.



## 5. DISCUSSIONE

I risultati del presente studio, possono essere considerati come una tappa non definitiva ma fondamentale nello sviluppo di un sistema telemetrico impiantabile che consenta lo studio della neurochimica cerebrale e del movimento in animali realmente *freely moving*. Le ricerche precedenti, infatti, pur gettando le basi sia per lo sviluppo delle componenti sensoristiche, sia della bioelettronica e della biotelemetria, non prevedono un reale utilizzo *in-vivo* in quanto non adeguatamente miniaturizzate. L'estrema semplificazione dell'elettronica ed un firmware raffinato ed ottimizzato, ma soprattutto l'ingresso sul mercato di nuovi microcontrollori ad alta performance e bassissimo consumo, sono tutte condizioni che hanno reso possibile lo sviluppo attuale.

Il peso, estremamente ridotto, dell'unità impiantabile (12.4 g. inclusa la batteria) e le piccole dimensioni (3.2 x 2.1 x 1.4 mm) consentono ai ratti di potersi muovere liberamente senza interferire sulle normali attività degli animali. Inoltre, essendo un sistema completamente privo di cavi elettrici (il sistema telemetrico è wireless), è stato possibile lavorare su ratti *freely-moving*, posizionati all'interno di un'arena in plexiglas, per tutta la durata dell'esperimento. L'impiantabilità dell'unità telemetrica è stata

possibile solo dopo uno studio approfondito sulle geometrie della unità stessa e dei sensori amperometrici. Le numerose prove portate avanti durante la ricerca, hanno consentito di sviluppare un protocollo altamente affidabile e riproducibile per l'impianto intracerebrale dei sensori, integrati nell'unità biotelemetrica, tramite chirurgia stereotassica. Nel protocollo si è tenuto conto della salute dell'animale riducendo al minimo l'invasività del sistema. La stessa geometria conica e le ridotte dimensioni dei microsensori ideati nel nostro laboratorio inducono un danno trascurabile rispetto agli stessi presenti, ad oggi, in letteratura.

Oltre ai biosensori ed ai microsensori amperometrici, il sistema telemetrico ha previsto l'integrazione di un piccolo sensore di movimento/vibrazione. Durante il periodo di attivazione neuronale indotta dal tail pinch, si è avuto un incremento dell'attività motoria dell'animale, la quale è risultata essere direttamente proporzionale all'aumento delle concentrazioni striatali di AA e lattato. Al contrario, le concentrazioni di glucosio hanno subito una diminuzione rispetto alle concentrazioni striatali di base. La riduzione del glucosio è proporzionale all'aumento dei movimenti del ratto nei 5' della stimolazione fisiologica. L'inversione del trend del movimento, si è avuto solo dopo 20' dal termine del tail pinch, ossia, quando il ratto ha

ridotto i movimenti riportando il tracciato non solo ai livelli precedenti lo stimolo ma addirittura inferiori.

Durante lo studio, sono stati condotti numerosi esperimenti, oltre al tail pinch, sia per poter validare il sistema nell'insieme, sia per seguire l'andamento dell'AA, dell'O<sub>2</sub>, del glucosio e del lattato nelle diverse condizioni, fisiologiche e farmacologiche, alle quali veniva sottoposto l'animale (dati non riportati). La maggior parte di questi esperimenti devono essere ripetuti in futuro per ottenere una significatività statistica. È importante ricordare che i device voltammetrici sono stati impiantati singolarmente per ogni esperimento.

I risultati neurochimici ottenuti, suggeriscono un consumo di glucosio ed una produzione di lattato durante l'attivazione neuronale seguita da un aumento extracellulare di glucosio conseguente una glicogenolisi astrogliale (Fillenz et al., 1999). La figura 24 mostra l'analisi della correlazione di Pearson delle variazioni di corrente indotte dal tail pinch. Quest'analisi relaziona le correnti di O<sub>2</sub>, AA, glucosio e lattato e nel grafico queste correnti sono plottate una verso l'altra.

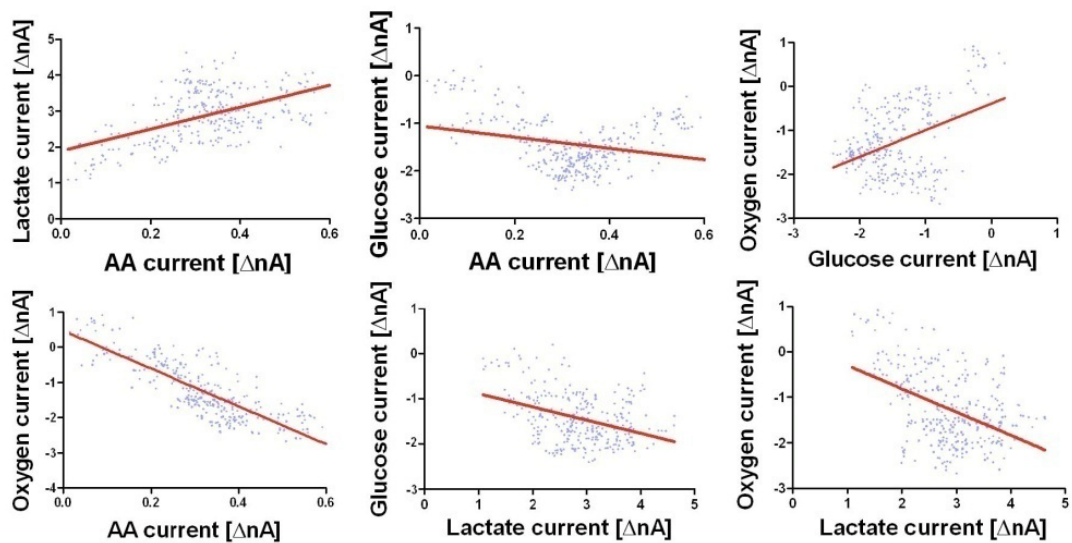


Fig. 24. Analisi della correlazione di Pearson dei cambiamenti della neurochimica striatale, durante l'attivazione neuronale.

E' importante sottolineare che un aumento delle correnti anodiche (AA, glucosio, lattato) riflette un aumento striatale delle relative molecole, mentre un aumento delle corrente catodiche dell'ossigeno, risultante in un segnale più negativo, corrisponde ad un suo aumento negli spazi extracellulari. I risultati di questa correlazione sono stati riassunti nella tabella 1.

	Acido ascorbico	Glucosio	lattato
ossigeno	r = -0.819 P $\square$ 0.0001	r = 0.401 P $\square$ 0.0001	r = -0.457 P $\square$ 0.0001
Accido ascorbico		r = -0.266 P $\square$ 0.0001	r = 0.518 P $\square$ 0.0001
glucosio			r = -0.388 P $\square$ 0.0001

Tabella 1. Risultati dell'analisi di correlazione dei cambiamenti della neurochimica striatale, durante l'attivazione neuronale.



Di recente, Castro e collaboratori (Castro et al., 2009) hanno proposto un nuovo ruolo centrale dell'acido ascorbico come modulatore dello "switch" metabolico tra glucosio e lattato, utilizzati come substrati energetici dai neuroni. Nella review di Castro, basata principalmente su risultati *in-vitro*, sono sintetizzate le evidenze sperimentali che legano glutammato, AA, glucosio e lattato durante l'attivazione neuronale. Nella figura 25, viene riproposto il modello suggerito da Castro modificato in base ai nostri risultati ottenuti *in-vivo*. In breve, in condizioni fisiologiche normali, sia neuroni che astrociti utilizzano glucosio come substrato energetico. Dopo l'attivazione neuronale, le terminazioni cortico-striatali rilasciano glutammato (1) nel compartimento extracellulare striatale (Miele et al., 2000). Immediatamente dopo, il glutammato, rilasciato dalle terminazioni sinaptiche, è captato dagli astrociti e scambiato (Rice 2000) con l'AA (2). L'aumento *in-vivo* dell'AA extracellulare durante il tail pinch è in accordo con questo meccanismo. L'ingresso del glutammato negli astrociti, stimola l'internalizzazione del glucosio (3), la glicolisi (4) e l'efflusso di lattato dall'astrocita (5). Durante gli esperimenti è stata notata una riduzione del glucosio extracellulare ed un aumento del lattato durante il tail pinch, in accordo con questo

modello. In fine, l'AA entra nei neuroni (6) attraverso un trasportatore specifico (SVCT2) e attiva lo "switch" metabolico (Castro et al. 2009), stimolando l'internalizzazione del lattato nei neuroni (7) e inibendo il consumo del glucosio (8). Inoltre l'aumento del segnale locale di ossigeno durante l'attivazione neuronale, potrebbe riflettere un aumento dell' rCBF (Bazzu et al., 2009; Calia et al., 2009). Immediatamente dopo la fine della stimolazione fisiologica, la corrente di AA ha invertito il suo trend e con un lento (10 min) ritorno ai livelli di base. Le correnti di ossigeno e lattato hanno continuato a salire per 5 min. dopo la fine del tail pinch per poi scendere lentamente e rientrare ai livelli iniziali di linea di base. La discesa del glucosio durante l'attivazione neuronale, è seguita da un suo aumento come risultate di una glicogenolisi (Fillenz et al; 1999) astrogliale.

I dati di post-attivazione (post tail pinch) sono complessi da interpretare e suggeriscono che il ritorno alle condizioni normali di inattività possa implicare un riutilizzo del glucosio come substrato energetico dei neuroni. È importante ricordare che l'AA è ossidato nei neuroni ad acido diidroascorbico (DHAA) dai ROS e RNS. (Serra et al., 2002). Il DHAA, secreto nello spazio extracellulare, entra negli astrociti attraverso il trasportatore GLUT1 e qui è nuovamente ridotto ad AA. (Hediger, 2002). Un aumento sostenuto del glucosio

extracellulare, potrebbe interferire con il ciclo AA/DHAA e portare ad uno stress ossidativo, perdita di AA e conseguente danno neuronale.

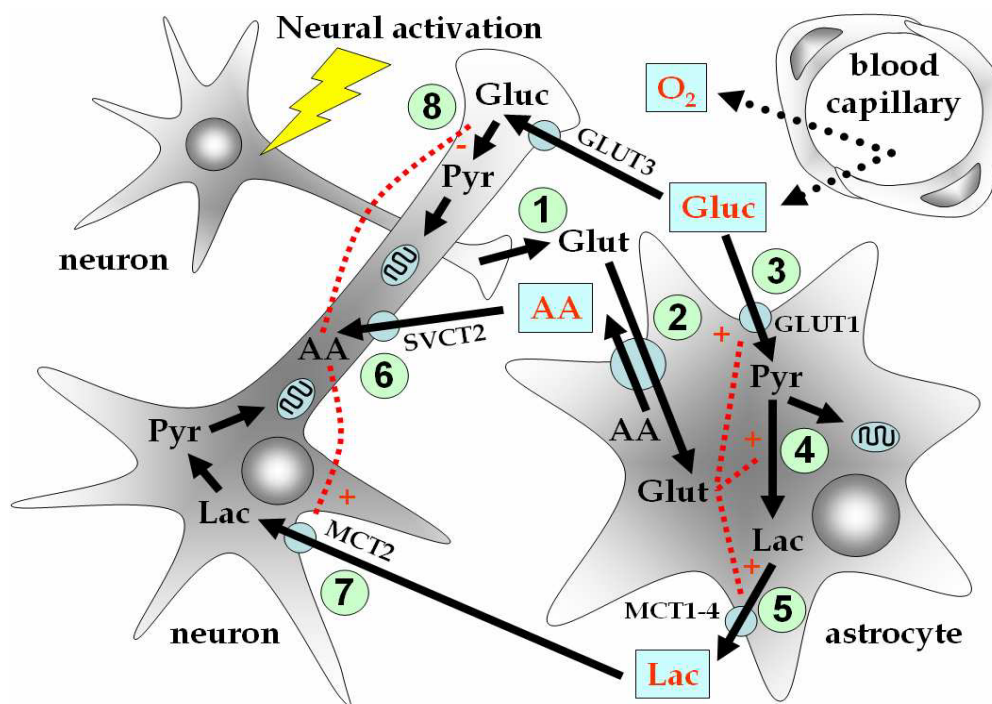


Fig. 25. Cambiamenti dei *pathway* neurochimici del metabolismo energetico cerebrale durante un'attivazione neuronale. Glut: glutammato; Gluc: glucosio; Lac: lattato; Pyr: piruvato; GLUT: trasportatore di glucosio; SVCT: trasportatore dell'acido ascorbico; MCT: trasportatore del lattato.

Questi risultati *in-vivo* suggeriscono che, durante l'attivazione neuronale, in condizioni fisiologiche, le modifiche extracellulari striatali delle molecole su indicate riflettono primariamente la risposta

astrocitaria ad una stimolazione glutammatergica. Ulteriori studi farmacologici *in-vivo* sono necessari per confermare le evidenze *in-vitro* sull'utilizzo dei substrati bioenergetici da parte dei neuroni in differenti condizioni sperimentali.



## 6. CONCLUSIONI

In questa tesi ho descritto lo sviluppo di una rete distribuita di sensori per il monitoraggio biotelemetrico della neurochimica cerebrale utilizzando microsensori e biosensori amperometrici. Le unità biotelemetriche impiantabili, basate su semplici componenti a basso costo, sono state utilizzate con successo per la trasduzione, estremamente accurata, dei segnali elettrochimici generati sulla superficie dei sensori impiantati nello striato dei ratti *freely moving*.

In questo studio di sviluppo, il sistema mostra un'elevata stabilità ed un'eccellente risposta lineare in un range di correnti incentrato sui nanoampere. La scelta della tecnologia complementari MOS (CMOS) a bassa potenza, rende il progetto sviluppabile in futuro in determinate direzioni, come la riduzione dei consumi o la miniaturizzazione. Come risultato degli esperimenti *in-vivo*, ho mostrato alcuni dati preliminari ottenuti monitorando importanti molecole cerebrali durante una breve attivazione neuronale indotta da 5 minuti di tail pinch. Lo studio è stato realizzato utilizzando nuovi microsensori, biosensori ed unità biotelemetriche sviluppate di recente, con la finalità di registrare modifiche in tempo reale di marcatori neurochimici chiave del metabolismo bioenergetico

cerebrale. Infatti, tutte le specie studiate (AA, O<sub>2</sub>, glucosio, lattato) sono implicate nella bioenergetica cellulare.





## 7. BIBLIOGRAFIA

**Andersen J.K.** (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.*, 10, 18-25.

**Aubert A.**, Costalat R., Magistretti P.J., Pellerin L. (2005). Brain lactate kinetics: modelling evidence for neuronal lactate uptake upon activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 16448-16453.

**Bazzu G.**, Puggioni G.G., Dedola S., Calia G., Rocchitta G., Migheli R., Desole M.S., Lowry J.P., O'Neill R.D., Serra P.A. (2009). Real-time monitoring of brain tissue oxygen using a miniaturized biotelemetric device implanted in freely-moving rats. *Anal. Chem.*, 81, 2235–2241.

**Calia G.**, Rocchitta G., Migheli R., Puggioni G.G., Spissu Y., Bazzu G., Mazzarello V., Lowry J.P., O'Neill R.D., Desole M.S. & Serra, P.A. (2009). Biotelemetric Monitoring of Brain Neurochemistry in Conscious Rats Using Microsensors and Biosensors. *Sensors*, 9, 2511-2523.

**Castro M.A.**, Beltr.n F.A., Brauchi S., Concha II. (2009). A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *J. Neurochem.*, 110 (2), 423-440.

**Emerit J. & Edeas M.** (2005). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 15, 100-101.

**FCC** (Federal Communication Commission). (2000). Commission's Rules to Create a Wireless Medical Telemetry Service; FCC : Washington, DC, USA. FCC 00-211, 1-24.

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

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

**Hediger M.A.** (2002). New view at C. *Nat. Med.*, 8, 445-446.

**Leuher D.C.** (1983). Overview of biomedical telemetry techniques. *Eng. Med. Biol.*, 3, 17-24.

**Lowry J.P.**, Miele M., O'Neill R.D., Boutelle M.G., Fillenz M. (1998). An amperometric glucose oxidase/poly(o-phenylenediamine) biosensor for monitoring brain extracellular glucose: In vivo characterisation in the striatum striatum of freelymoving rats. *J. Neurosci. Methods*, 79, 65-74. Name of the book (Header position 1,5) 22

**Magistretti P.J.**, Pellerin L., Rothman D.L., Shulman R.G. (1999). Energy on demand. *Science*, 283, 496-497.

**McMahon C.P.**, Rocchitta G., Serra P.A., Kirwan S.M., Lowry J.P., O'Neill R.D. (2006). The efficiency of immobilised glutamate oxidase

decreases with surface enzyme loading: an electrostatic effect, and reversal by a polycation significantly enhances biosensor sensitivity. *Analyst*, 131(1), 68-72.

**Miele M.**, Mura M.A., Enrico P., Esposito G., Serra P.A., Migheli R., Zangani D., Miele E., Desole M.S. (2000). On the mechanism of d-amphetamine-induced changes in glutamate, ascorbic acid and uric acid release in the striatum of freely-moving rats. *Br. J. Pharmacol.*, 129, 582-588.

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

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

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

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

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

**Scheller F. W.**, Schubert, F., Fedrowitz J. (1997). Present state and frontiers in biosensorics. *EXS*, 80, 1-9.

**Schuvailo O.M.**, Soldatkin O.O., Lefebvre A., Cespuglio R., Soldatkin A.P. (2006). Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate. *Analytica Chimica Acta*, 573, 110–116.

**Serra P.A.**, Sciola L., Delogu M.R., Spano A., Monaco G., Miele E., Rocchitta G., Miele M., Migheli R., Desole M.S. (2002). The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine induces apoptosis in mouse nigrostriatal glia. Relevance to nigral neuronal death and striatal neurochemical changes. *J Biol Chem.*, 277, 34451-34461.

**Serra P.A.**, Rocchitta G., Bazzu G., Manca A., Puggioni, G.M., Lowry J.P., O'Neill R.D. (2007). Design and construction of a low cost single-supply embedded telemetry system for amperometric biosensor applications. *Sens. Actuat B*, 122, 118-126.

**Watanabe Y.**, Hyllbrant B.B., Langstrom B. (1997). Tracing oxygen metabolism by use of positron emitter Oxygen-15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 231, 131-134.

**Wilson R. & Turner, A.P.F.** (1992). Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosens. Bioelectron.*, 7, 165-185.

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

**Zhou R.J.**, Hao Z.Q. (2002). The present status and development of biotelemetry. *Zhongguo Yi Liao Qi Xie Za Zhi*, 26, 212-214.



## 8. RIASSUNTO

In questo lavoro di tesi, viene presentato uno studio sullo sviluppo di una rete distribuita di sensori per il monitoraggio biotelemetrico della neurochimica cerebrale utilizzando microsensori e biosensori amperometrici.

Le unità biotelemetriche impiantabili, basate su semplici componenti a basso costo, sono state utilizzate con successo per la trasduzione, estremamente accurata, dei segnali elettrochimici generati sulla superficie dei sensori impiantati nello striato dei ratti *freely-moving* mediante chirurgia stereotassica. In questo stadio di sviluppo, il sistema mostra un'elevata stabilità ed un'eccellente risposta lineare. Come risultato degli esperimenti *in-vivo*, sono stati valutati alcuni dati preliminari ottenuti monitorando importanti molecole cerebrali durante una breve attivazione neuronale (5 minuti di tail pinch). Lo studio è stato realizzato utilizzando nuovi microsensori, biosensori ed unità biotelemetriche sviluppate di recente nel nostro laboratorio, con la finalità di registrare modifiche in tempo reale di marcatori neurochimici chiave del metabolismo bioenergetico cerebrale. Infatti, tutte le specie studiate (AA, O<sub>2</sub>, glucosio, lattato) sono implicate nella bioenergetica cellulare. I risultati *in-vivo* indicano che, durante l'attivazione neuronale, in condizioni fisiologiche, le modifiche

extracellulari striatali delle molecole su indicate riflettono primariamente la risposta astrocitaria ad una stimolazione glutammatergica.

Ulteriori studi farmacologici *in-vivo* sono necessari per confermare le evidenze *in-vitro* sull'utilizzo dei substrati bioenergetici da parte dei neuroni in differenti condizioni sperimentali.