

1. Riassunto.

Il termine stress ossidativo identifica una modificazione del normale equilibrio intracellulare esistente tra sostanze ossidanti, prodotte fisiologicamente dalle cellule durante i processi metabolici, e l'efficienza dei sistemi di difesa antiossidanti. Quando le sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS), prevalgono e/o le sostanze antiossidanti si riducono, si instaura una condizione di stress ossidativo.

Tessuti diversi presentano differente suscettibilità allo stress ossidativo; il sistema nervoso centrale è estremamente sensibile a questo tipo di danno per diverse ragioni che includono un basso livello di enzimi antiossidanti, un elevato contenuto di substrati ossidabili e una gran quantità di ROS prodotte durante le reazioni neurochimiche.

Diverse evidenze di letteratura indicano che lo stress ossidativo svolga un ruolo patogenico rilevante sia nell'invecchiamento precoce che in alcune gravi patologie a sfondo infiammatorio e/o degenerativo, quali l'aterosclerosi e la Malattia di Alzheimer (AD). Esso è l'effetto indesiderato della rottura di un equilibrio biochimico e, come tale, può influenzare l'esordio e/o il decorso di un gran numero di patologie.

L'AD, un disordine neurodegenerativo età – dipendente, è la più comune causa di demenza ed è clinicamente associata a deterioramento delle funzioni cognitive, deficit di linguaggio, perdita delle abilità motorie e cambiamenti del comportamento.

Il MCI è considerato una fase intermedia tra il normale processo di invecchiamento e l'AD; persone affette da tale patologia mostrano un lieve decadimento delle capacità cognitive senza segni di demenza. Alcuni di questi pazienti possono rimanere stabili, altri possono sviluppare l'AD (nel 10-20% dei casi).

Scopo della tesi è di valutare i livelli plasmatici di alcuni marker di stress ossidativo in pazienti affetti da AD e da decadimento cognitivo lieve (MCI). In questo studio sono stati analizzati, in particolare, 32 pazienti, di cui 18 con AD e 14 con MCI, e 33 controlli tutti reclutati nel territorio della Lunigiana, nell'ambito di uno studio condotto presso il Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Pisa. I due gruppi presi in considerazione in questo lavoro di tesi sono omogenei per sesso ed età.

Le analisi sono state condotte su campioni di plasma e sono stati valutati i seguenti marker di stress ossidativo:

- AOPP (prodotti di ossidazione avanzata delle proteine): marker che identifica la quantità di proteine modificate da processi di ossidazione, a livello di specifici residui amminoacidici, ad opera di specie chimiche reattive;
- FRAP (capacità ferro riducente del plasma): marker che identifica il potere antiossidante del plasma, attraverso la reazione di riduzione dello ione ferrico in ione ferroso;
- GSH (glutathione): molecola che si trova in gran quantità nella maggior parte delle cellule; tale molecola, grazie al suo gruppo tiolico libero, rappresenta il principale meccanismo protettivo contro lo stress ossidativo, essendo il più potente fra gli antiossidanti prodotti dall'organismo.

Per valutare le possibili correlazioni tra i valori ottenuti è stata effettuata un'analisi statistica, utilizzando il *test t di Student*.

Da tale analisi è emerso che i livelli plasmatici degli AOPP risultano incrementati, mentre i livelli della FRAP e del glutathione totale risultano diminuiti nei pazienti, AD e MCI, rispetto ai relativi controlli; queste differenze sono statisticamente significative per tutti e tre i marker di stress ossidativo analizzati. Dopo stratificazione per sesso, si osserva che i livelli plasmatici degli AOPP risultano incrementati e i livelli della FRAP e del GSH risultano diminuiti, sia nei pazienti uomini che nelle pazienti donne rispetto ai relativi controlli e questa differenza è statisticamente significativa per entrambi i sessi.

L'analisi dei dati effettuata sul confronto tra i pazienti AD contro i pazienti MCI non evidenzia alcuna differenza nei livelli plasmatici degli AOPP e del glutathione, sia quando i due gruppi vengono analizzati nella totalità sia quando vengono separati per sesso. Confrontando i valori delle FRAP dei pazienti affetti da MCI rispetto ai pazienti affetti da AD si scopre che, per questo marker di stress ossidativo, vi è una differenza statisticamente significativa che si mantiene, dopo stratificazione per sesso, solo se si mettono a confronto pazienti MCI uomini con pazienti AD dello stesso sesso, ma no se si confrontano le pazienti MCI donne contro le pazienti AD dello stesso sesso

I risultati ottenuti indicano che lo stress ossidativo potrebbe rappresentare, nella malattia di Alzheimer e nel deterioramento cognitivo lieve, un fattore chiave per l'insorgenza della malattia.

2. Introduzione.

2.1 Lo stress ossidativo.

Il termine stress ossidativo indica l'insieme delle alterazioni che si manifestano a livello di tessuti, cellule e macromolecole biologiche quando queste vengono esposte ad un eccesso di agenti ossidanti (Corti et al., 2009).

In tutti gli organismi aerobi esiste un delicato equilibrio, detto ossido-riduttivo, tra la produzione di sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS), e il sistema di difesa antiossidante che ha il compito di prevenire e/o riparare l'eventuale danno prodotto. Tutte le forme di vita conservano, all'interno delle loro cellule, un ambiente riducente che viene preservato da enzimi che mantengono lo stato ridotto attraverso un costante apporto di energia metabolica. Disturbi del normale stato redox possono provocare effetti tossici attraverso la produzione di specie chimiche reattive che danneggiano le componenti della cellula incluse proteine, lipidi e acidi nucleici (Siciliano et al., 2007).

Le ROS e altre specie reattive vengono continuamente prodotte dal nostro organismo attraverso numerosi processi biochimici (Uttara et al., 2009). Determinate quantità di sostanze ossidanti sono infatti indispensabili per mantenere il corretto funzionamento cellulare, regolando i meccanismi propri dell'omeostasi (Iorio, 2007).

Durante le reazioni di riduzione dell'ossigeno, però, le specie reattive generate possono superare il valore soglia fisiologico. Se tali molecole non vengono neutralizzate dai sistemi antiossidanti, si possono instaurare danni all'interno della cellula, in grado di condurre la stessa ad apoptosi (Maiese et al., 2008).

Quindi, se si genera uno sbilanciamento tra la produzione di ROS e l'efficacia del sistema di difesa antiossidante, si stabilisce una condizione di stress ossidativo, come mostrato in figura 1 (Sompol et al., 2009).

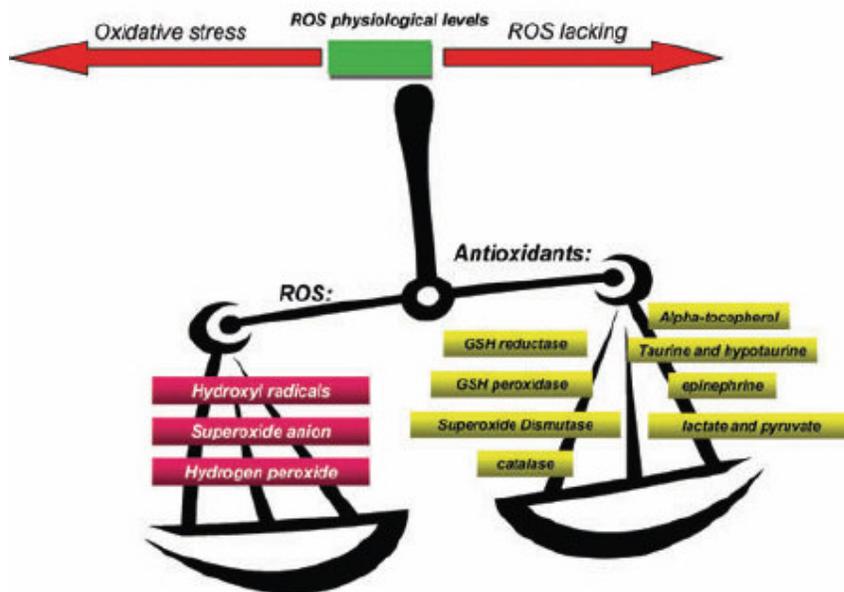


Figura 1. *Modificazione del normale equilibrio tra ROS e sostanze antiossidanti (da Nutrizione e stress ossidativo. Vito Curci. 9 maggio 2009 Villa Lagarina (TN)).*

2.2 Specie chimiche reattive.

Le specie chimiche reattive (SCR) sono ioni, semplici o complessi, che hanno la tendenza a reagire, a seconda della loro natura e del mezzo in cui si trovano, con altre specie chimiche con cui vengono a contatto. In genere agiscono da agenti ossidanti e questa caratteristica conferisce loro la capacità di indurre danno ossidativo se vengono prodotte in eccesso (Iorio, 2007). A seconda dell'atomo responsabile della loro reattività, le SCR possono essere classificate in specie reattive dell'ossigeno (ROS), specie reattive dell'azoto (RNS) e specie reattive del carbonio (RCS). Queste, a loro volta, possono essere distinte in forme radicaliche e non radicaliche a seconda che abbiano o meno, rispettivamente, almeno un elettrone spaiato in uno degli orbitali più esterni (Iorio, 2007), come mostrato nella seguente tabella:

Specie chimica	Formula	Natura
Anione superossido	$\cdot\text{O}_2^-$	R
Ossigeno singoletto	$^1\text{O}_2^*$	R (?)
Perossido di idrogeno	H_2O_2	N-R
Idrossile	$\text{HO}\cdot$	R
Alcossile	$\text{RO}\cdot$	R
(Alchil)idroperossile	ROOH	NR
Ossido nitrico	$\text{NO}\cdot$	R
Diossido nitrico	$\text{NO}_2\cdot$	R
Acido nirtoso	HNO_2	N-R
Perossinitrito	ONOO^-	N-R
(Alchil)tiile (da R-SH)	$\text{RS}\cdot$	R

R: specie radicalica. **N-R:** specie non radicalica. *: stato energetico attivato

Tabella 1. Specie reattive di maggiore interesse biologico (modificato da Iorio, 2007).

Tra le forme radicaliche, i radicali liberi sono definiti come specie chimiche reattive aventi un singolo elettrone spaiato nell'orbitale esterno, come mostrato in figura 2 (Rahman 2007). Questa caratteristica conferisce loro una configurazione instabile tale da renderle capaci di reagire con diverse molecole quali proteine, lipidi, carboidrati e acidi nucleici e dalle quali sottraggono un elettrone, ossidandole, nel tentativo di acquisire stabilità. In tal modo vengono prodotti altri radicali liberi secondo reazioni che si propagano a catena (Iorio, 2007).

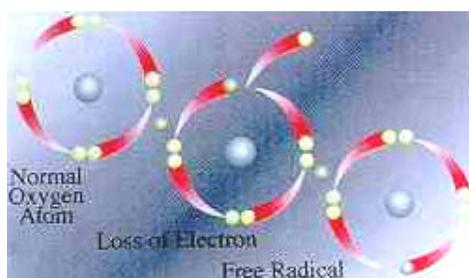


Figura 2. Meccanismo di generazione dei radicali liberi. (da www.healingbaily.com/condition/free-radicals.htm).

Le SRC di natura non radicalica, invece, possiedono una struttura molecolare in cui tutti gli elettroni sono disposti in coppie, generalmente impegnati a formare legami di tipo covalente tra i vari atomi costituenti (Iorio, 2007).

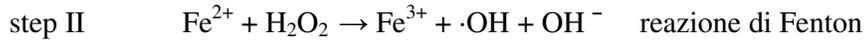
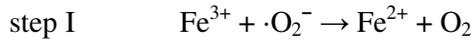
È noto che le SCR hanno un duplice ruolo nei sistemi biologici, sia benefico che dannoso. (Valko et al., 2006). Mostrano un effetto benefico quando, ad esempio, vengono utilizzate dal sistema immunitario come agenti in grado di bloccare l'azione patogena di diversi microrganismi o quando sono utilizzate come forma di comunicazione cellulare mediando la trasmissione di segnali biochimici tra le cellule (Corti et al., 2009). Al contrario, se le sostanze ossidanti sono presenti ad alte concentrazioni, e/o il sistema antiossidante non è in grado di neutralizzarle, possono essere danneggiate diverse componenti della cellula: i fosfolipidi di membrana, con perdita di compartimentazione cellulare e dei trasporti selettivi; gli acidi nucleici, con accumulo di mutazioni ed alterazioni dell'espressione genica e le proteine, dove l'ossidazione di alcuni gruppi amminoacidici causa modificazioni della struttura e perdita di funzione enzimatica, recettoriale e di trasporto (Corti et al., 2009).

I radicali liberi centrati sull'ossigeno sono i principali sottoprodotti formati nelle cellule degli organismi aerobi (Rahman, 2007). Le ROS rappresentano la maggior parte dei radicali che, se prodotti in eccesso, danneggiano i sistemi biologici; più precisamente, possono dare il via a reazioni autocatalitiche in modo tale che le molecole con le quali reagiscono sono esse stesse convertite in radicali liberi che, a loro volta, sono in grado di propagare il danno (Rahman, 2007). Tra le ROS prodotte a livello cellulare, le più comuni sono il radicale idrossile ($\text{OH}\cdot$), l'anione superossido ($\cdot\text{O}_2^-$) e l'ossido nitrico ($\text{NO}\cdot$) (Uttara et al., 2009).

Anche le forme non radicaliche come il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il perossinitrito (ONOO^-) possono, in molti casi, indurre danno cellulare generando radicali attraverso varie reazioni chimiche (Uttara et al., 2009).

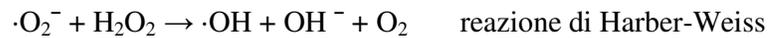
In tutti i meccanismi di generazione delle ROS, la prima tappa è l'attivazione dell'ossigeno molecolare (O_2) da parte di sistemi cellulari che hanno evoluto una serie di metallo-enzimi in grado di facilitare la produzione delle ROS, a seguito delle interazioni dei metalli ridotti con l'ossigeno. Poiché i radicali liberi sono tossici, le cellule hanno un efficiente sistema di regolazione che regola la produzione di ROS e di radicali liberi (Uttara et al., 2009).

L' $\cdot\text{O}_2^-$ può ridurre lo ione ferrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}); quest'ultimo, a sua volta, può decomporre il H_2O_2 secondo la reazione di Fenton:



in cui lo ione Fe^{2+} , ossidandosi a ione Fe^{3+} , cede il suo elettrone ad una molecola di H_2O_2 e ne scinde uno dei legami covalenti generando un radicale libero, il radicale idrossile ($\text{OH}\cdot$), ed un anione, lo ione idrossile (OH^-) (Iorio, 2007).

Combinando gli step I e II otteniamo la reazione di Harber-Weiss, secondo la quale, l' $\cdot\text{O}_2^-$ può reagire con il H_2O_2 e indurre la formazione del $\cdot\text{OH}$ e dello ione OH^- , come mostrato nella seguente reazione:



2.2.1 Meccanismi di generazione delle specie chimiche reattive.

La quantità totale delle SRC che vengono generate nelle cellule è determinata da diversi fattori; in generale, si possono distinguere le due fonti di produzione delle SCR in endogene ed esogene (Valko et al., 2006; Rahman, 2007).

Le risorse endogene includono i mitocondri, il metabolismo del citocromo P450, i perossisomi e l'attivazione delle cellule infiammatorie (Valko et al., 2006; Rahman, 2007).

I mitocondri sono responsabili della produzione di ATP, attraverso la fosforilazione ossidativa, che fornisce l'energia necessaria per le funzioni cellulari (Iorio, 2007).

In condizioni fisiologiche, l'1%-2% di O_2 molecolare consumato dalle cellule animali è convertito a ROS attraverso la perdita di elettroni dalla catena di trasporto mitocondriale (ETC: mitochondrial electron transport chain). Per tale motivo, i mitocondri rappresentano una fonte primaria di ROS endogene (McCord, 2000; Mancuso et al., 2006; Liu et al., 2009).

Diverse evidenze in letteratura dimostrano che la produzione e l'accumulo di ROS, aumenta quando la catena respiratoria mitocondriale è danneggiata da componenti chimiche (inibitori respiratori) o mutazioni in geni mitocondriali implicati nella biosintesi di polipeptidi che costituiscono gli enzimi respiratori (Liu et al., 2009).

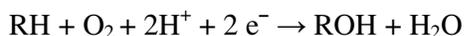
Sono stati identificati almeno due siti nella ETC dove si registra una sostanziale perdita di elettroni: a livello del gruppo flavinico del complesso I e a livello del sito dell'ubichinone del complesso III; da qui gli elettroni possono sfuggire e reagire con l' O_2 molecolare portando

ad una attiva produzione di radicali liberi (McCord, 2000; Maiese et al., 2008) e H₂O₂ che, anche se non è una specie radicalica, può comunque essere prodotta a livello mitocondriale (Rahman, 2007).

La produzione eccessiva di ROS dovuta a disfunzione mitocondriale può causare direttamente danno ossidativo a livello di macromolecole cellulari e condurre a instabilità della membrana, accumulo di proteine modificate e mutazioni al DNA (Liu et al., 2009).

Fonti endogene di ROS sono rappresentate anche dalle cellule infiammatorie come i neutrofili, gli eosinofili e i macrofagi. Questi ultimi, una volta attivati, danno il via ad un incremento dell'assunzione di ossigeno; tale aumento, a sua volta, dà origine alla produzione di una varietà di ROS incluso l'anione superossido, l'ossido nitrico e il perossido di idrogeno (Rahman, 2007).

Anche il Citocromo P₄₅₀ è un importante fonte di radicali liberi. La famiglia del citocromo P₄₅₀ (CYP, P₄₅₀) è una superfamiglia enzimatica di emoproteine appartenente alla sottoclasse enzimatica delle monoossigenasi. Spesso prendono parte a complessi con funzione di catena di trasporto di elettroni, noti come "sistemi contenenti P₄₅₀". (Danielson, 2002). I CYP, P₄₅₀ sono i maggiori attori coinvolti nella detossificazione dell'organismo, essendo in grado di agire su un gran numero di substrati, sia esogeni (farmaci e tossine di origine esterna), che endogeni (prodotti di scarto dell'organismo) (Danielson, 2002). In particolare, consentono l'incorporazione di un atomo di O₂ in un substrato organico (RH) e la riduzione del secondo ad H₂O, secondo la seguente reazione:



Tuttavia, il mancato funzionamento del ciclo catalitico del citocromo P₄₅₀ incrementa la possibilità di generare ROS in particolare ·O₂⁻ e H₂O₂ (Valko et al., 2006).

Altre sorgenti di ROS sono i microsomi e i perossisomi. I microsomi sono responsabili dell'80% dell'H₂O₂ prodotta *in vivo* a livello dei siti di iperossia; i perossisomi, in condizioni fisiologiche, sono importanti per la produzione di H₂O₂, ma non di ·O₂⁻. Anche se il fegato è l'organo primario dove il contributo dei perossisomi per la produzione complessiva di H₂O₂ è significativa, anche altri organi che contengono perossisomi, come il rene, sono implicati in questo meccanismo di generazione di H₂O₂ (Valko et al., 2006).

Recentemente, anche l'ossidazione perossisomiale degli acidi grassi è stata riconosciuta come una potenziale importante fonte di produzione di H₂O₂ (Valko et al., 2006).

Le ROS possono essere prodotte anche attraverso un gran numero di processi esogeni (Valko et al., 2006). Gli agenti ambientali possono generare direttamente, o indirettamente, le ROS. È stata osservata induzione di stress e danno ossidativo dopo esposizione a diversi tipi di xenobiotici: metalli (ridotti e non ridotti), ioni, radiazioni (UV, raggi gamma, raggi X), farmaci (barbiturici), contaminanti ambientali e agenti cancerogeni (Iorio et al., 2007), come mostrato nella figura sottostante.

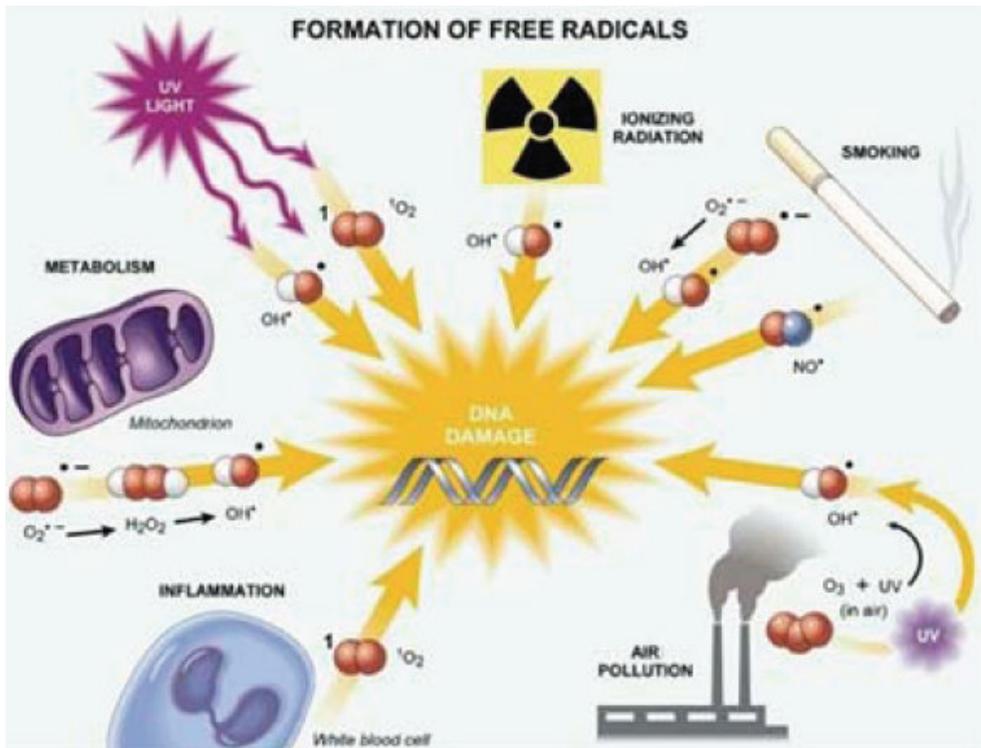


Figura 3. Meccanismi di produzione delle specie reattive (da *Nutrizione e stress ossidativo*. Vito Curci. 9 maggio 2009 Villa Lagarina (TN)).

2.3 Antiossidanti.

Il termine antiossidante indica tutte le molecole capaci di stabilizzare o disattivare i radicali liberi prima che essi danneggino le cellule, secondo il meccanismo mostrato in figura 4.

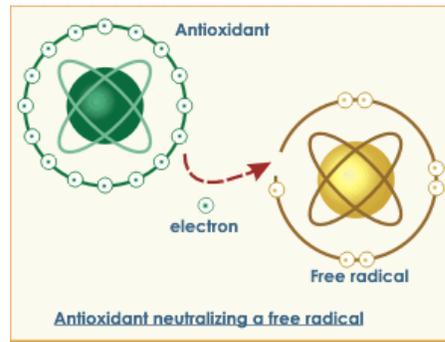


Figura 4. *Meccanismo con cui un antiossidante neutralizza un radicale libero*
(da www.gmvirtual.com/acaibasics.html)

L'organismo umano ha evoluto sistemi altamente complessi di difesa antiossidante, enzimatici e non enzimatici, i quali lavorano sinergicamente e in combinazione con altri sistemi di protezione cellulare contro il danno ossidativo. Un antiossidante ideale dovrebbe essere caratterizzato da: rapido assorbimento, alta efficienza nell'eliminazione dei radicali liberi e nel chelare i metalli ridotti, capacità di svolgere la sua azione in domini acquatici e/o di membrana (Rahman, 2007).

Gli antiossidanti sono classificati in endogeni ed esogeni; questi ultimi possono essere ottenuti in parte dalla dieta o tramite l'assunzione di integratori alimentari. Alcuni componenti alimentari che non neutralizzano i radicali liberi, ma che accrescono l'attività endogena possono comunque essere classificati come antiossidanti (Rahman, 2007).

Gli antiossidanti si dividono in molecole di natura enzimatica e non enzimatica. Gli antiossidanti enzimatici comprendono un numero limitato di proteine come le catalasi, la glutatione perossidasi e le superossido dismutasi (Uttara et al., 2009).

Gli antiossidanti non enzimatici, a loro volta, possono essere distinti in antiossidanti ad azione diretta ed indiretta. I primi, sono estremamente importanti nella difesa contro lo stress ossidativo e comprendono l'acido ascorbico e lipoico, polifenoli e caratenoidi; la cellula stessa può sintetizzare una minima quantità di queste molecole. I secondi includono agenti

chelanti e di legame per ridurre i metalli e prevenire la formazione dei radicali (Uttara et al., 2009).

2.3.1 Antiossidanti enzimatici.

La superossido dismutasi (SOD) è un enzima appartenente alla famiglia delle metalloproteine la cui funzione è quella di convertire il $\cdot\text{O}_2^-$ in O_2 e H_2O_2 (Rahaman, 2007) secondo la seguente reazione di dismutazione o di disproporzione:



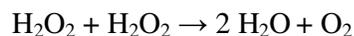
In questa reazione, una molecola di $\cdot\text{O}_2^-$ si ossida diventando ossigeno e l'altra molecola si riduce e si protona diventando H_2O_2 .

La SOD è presente in diverse isoforme, identificabili in base agli ioni presenti nel sito attivo (rame, ferro o manganese), alla composizione amminoacidica e alla distribuzione negli organismi. I geni che codificano per le SOD derivano da due geni ancestrali; da uno dei due geni deriva il gruppo delle Mn-SOD e delle Fe-SOD ampiamente diffuso tra tutti gli organismi aerobi, dai batteri alle piante fino all'uomo, dall'altro discende la famiglia delle Cu/Zn-SOD, distribuito esclusivamente tra gli organismi eucariotici (Rahaman, 2007).

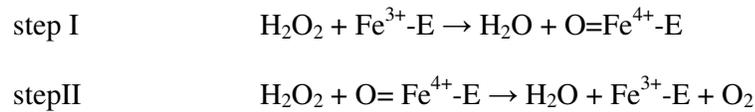
Nell'uomo sono presenti tre isoforme di SOD: la SOD1 è distribuita nel citoplasma, la SOD2 nei mitocondri, mentre la SOD3 è localizzata a livello extracellulare. La prima è un dimero di peso molecolare di 32 kDa, mentre le altre due sono tetrametri con peso molecolare di 96 kDa. La SOD1 e la SOD3 contengono rame e zinco, mentre la SOD2 contiene il manganese nel suo centro di reazione (rispettivamente Cu/Zn-SOD e Mn-SOD) (Rahaman, 2007).

Negli organismi aerobi, sono presenti due famiglie di enzimi, le catalasi e la glutazione perossidasi, capaci di degradare il H_2O_2 (Izawa et al., 1996).

Le catalasi (CAT) sono metalloproteine, localizzate a livello dei perossisomi delle cellule eucariotiche, il cui gruppo prostetico, la parte non proteica dell'enzima, è rappresentato dal ferro (Izawa et al., 1996). Questi enzimi hanno la capacità di proteggere i tessuti dai perossidi; la reazione catalizzata dalle catalasi è la decomposizione del H_2O_2 ad H_2O ed O_2 molecolare secondo la seguente reazione (Valko et al., 2006):



Anche se il completo meccanismo di azione delle catalasi non è ancora noto, si pensa che la suddetta reazione avvenga in due steps:



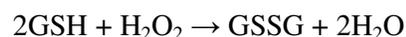
dove $\text{Fe}^{n+}\text{-E}$ rappresenta il ferro nel gruppo eme dell'enzima.

Mel momento in cui il H_2O_2 entra nel sito attivo, interagisce con gli amminoacidi asparagina (Ans 147) ed istidina (His 74), causando il trasferimento di un protone tra due atomi di ossigeno. Gli atomi di ossigeno liberi inducono la formazione di H_2O e reagiscono con il ferro per formare $\text{O}=\text{Fe}^{4+}$, il quale reagisce con una seconda molecola di H_2O_2 per riformare $\text{Fe}^{3+}\text{-E}$ e produrre O_2 e H_2O (Izawa et al., 1996).

Le CAT hanno un'alta velocità di turn-over: una molecola può convertire, ogni minuto, approssimativamente 6 milioni di molecole di H_2O_2 ad H_2O e O_2 (Rahaman, 2007).

Quando i livelli di perossido di idrogeno sono troppo bassi per attivare le catalasi, la decomposizione di tale SRC avviene per attivazione della glutatione perossidasi (Iorio, 2007), un enzima presente in due diverse forme, una selenio-dipendente (GPx), l'altra selenio indipendente (glutatione-S-tranferasi, GST). Le differenze sono dovute al numero di subunità, ai meccanismi catalitici e al legame del selenio nel centro attivo (Valko et al., 2006; Rahaman, 2007).

Nell'organismo umano sono presenti quattro tipi differenti di GPx, le quali hanno la funzione di ridurre i perossidi. La GPx agisce in associazione con il glutatione, una molecola presente ad alte concentrazioni nelle cellule che rappresenta uno dei più importanti meccanismi endogeni di difesa dai radicali liberi. La GPx utilizza come substrato il H_2O_2 o un perossido organico (ROOH) e catalizza la conversione dei perossidi ad acqua o alcol e, simultaneamente, reagendo con il H_2O_2 , ossida il glutatione (Valko et al., 2006; Rahaman, 2007):



In queste reazioni, la GPx catalizza la riduzione del H_2O_2 ad H_2O e quella dei perossidi organici ai corrispondenti alcoli stabili (ROH), utilizzando il glutatione come fonte di equivalenti riducenti.

Negli organismi maggiormente evoluti, la GPx sembra aver largamente soppiantato il bisogno delle catalasi nella difesa contro lo stress ossidativo. Inoltre, è un enzima molto importante nel prevenire la perossidazione lipidica per mantenere la struttura e la funzione delle membrane biologiche (McCord, 2000).

2.3.2 Antiossidanti non enzimatici.

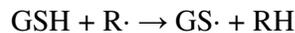
Gli antiossidanti non enzimatici includono diversi tipi di molecole tra le quali ricordiamo la vitamina E, un potente antiossidante liposolubile, che nell'uomo è presente in differenti forme delle quali la più attiva è l' α - tocoferolo (Valko et al., 2006). Ha un ruolo importante nella prevenzione dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, che rappresenta l'evento chiave nello sviluppo del processo di perossidazione lipidica. Tale evento, scatenato dall'azione di radicali liberi, si sviluppa attraverso delle reazioni a catena che continuano il processo (Valko et al., 2006). La vitamina E è in grado di bloccare questo fenomeno donando un atomo di idrogeno con un elettrone ai radicali perossilipidici, rendendoli in tal modo meno reattivi e bloccando di fatto la perossidazione lipidica. Tale reazione redox trasforma la vitamina E in un radicale α -tocoferossilico che è piuttosto stabile e che può reagire con la vitamina C o con il glutatione per riformare l' α -tocoferolo (Valko et al., 2006). Poiché lo sviluppo della perossidazione lipidica può determinare profonde alterazioni delle membrane cellulari, si comprende il motivo per cui alla vitamina E è riconosciuto un ruolo importante nel mantenere tali strutture indenni (Valko et al., 2006).

Un altro importante antiossidante è la Vitamina C, una molecola idrosolubile che può essere presente in due forme, una ridotta (acido ascorbico) ed una ossidata (acido deidroascorbico) tra loro interconvertibili. Come già detto, la vitamina C è implicata nella rigenerazione della forma non radicalica della vitamina E, dopo che questa ha reagito con un radicale libero. In determinate circostanze può agire da agente riducente: ad esempio, in presenza di metalli di transizione (Fe^{3+} e Cu^{2+}) può innescare la perossidazione lipidica. Ciò nonostante, l'azione antiossidante è, in vivo, superiore a quella pro-ossidante (Iorio, 2007).

Un gruppo importante di antiossidanti non enzimatici è rappresentato dai tioli. I gruppi tiolici (SH) sono essenziali per la protezione degli effetti dannosi delle ROS (Valko et al., 2006). Il

più importante antiossidante tiolico è il glutathione ridotto (GSH), un tripeptide formato da cisteina, glicina e glutammato. Il GSH è tra i più efficaci antiossidanti prodotti a livello intracellulare, è molto abbondante nel citosol (1-11 mM), a livello di nuclei (3-15 mM) e dei mitocondri (5-11 mM) ed è considerato il maggiore antiossidante solubile in questi compartimenti cellulari (Valko et al., 2006). Generalmente, la capacità antiossidante dei composti tiolici è dovuta all'atomo di zolfo il quale può facilmente favorire la perdita di un singolo elettrone. La vita della specie radicalica così generata, come il radicale tiile (GS·), può essere significativamente più lunga di molti altri radicali generati durante lo stress ossidativo (Valko et al., 2006).

La reazione del glutathione con un radicale R·, può essere così descritta:



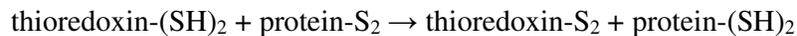
Il radicale così generato, può dimerizzare per formare il prodotto non radicalico GSSG:



Il glutathione ossidato (GSSG) è accumulato all'interno delle cellule e il rapporto GSH/GSSG è un buon indice di stress ossidativo di un organismo. Le principali caratteristiche protettive del GSH come meccanismo di difesa contro lo stress ossidativo sono dovute alle seguenti proprietà (Valko et al., 2006):

- è un cofattore di diversi enzimi di detossificazione contro lo stress ossidativo, come la glutathione perossidasi e la glutathione transferasi (Valko et al., 2006);
- partecipa al trasporto degli amminoacidi attraverso le membrane plasmatiche (Valko et al., 2006);
- ha la funzione di “scavenger” (letteralmente, spazzare) nei confronti degli idrossidi e dell'ossigeno singoletto, di detossificare il perossido di idrogeno e i lipoperossidi attraverso l'azione catalitica della glutathione perossidasi (Valko et al., 2006);
- è in grado di rigenerare i più importanti antiossidanti, vitamina C ed E dalle loro forme attive (Valko et al., 2006);
- può ridurre il radicale tocoferolo della vitamina E direttamente, o indirettamente, attraverso la riduzione del semideidroascorbato ad ascorbato (Valko et al., 2006).

Un altro antiossidante tiolico è la tioredoxina (TRX), una proteina con attività ossidoriduttasica che è presente sia nelle cellule dei mammiferi che dei procarioti (Rahman, 2007). Contiene un disulfide e due cisteine attive ridotte all'interno di un sito attivo conservato (Cys–Gly–Pro–Cys). Nella sua forma ridotta, la TRX contiene due gruppi SH adiacenti che sono convertiti in una unità disulfide nella TRX ossidata quando essa subisce reazioni redox con molteplici proteine (Valko et al., 2006):



Il terzo antiossidante tiolico è l' Acido α -lipoico (ALA). È un disulfide derivato dall'acido octanoico, può essere sia liposolubile che idrosolubile e, per questo, è largamente distribuito nelle membrane cellulari e nel citosol sia di cellule eucariotiche che procariotiche. L'ALA è rapidamente assorbito dalla dieta e convertito nella sua forma ridotta, l'acido diidrolipoico (DHLA) (Valko et al., 2006). Entrambe le forme sono dei potenti antiossidanti e svolgono la propria azione attraverso lo “scavenger” dei radicali liberi, chelano gli ioni metallici, riciclano gli antiossidanti e riparano le proteine danneggiate dallo stress ossidativo. Il DHLA ha un'azione fortemente antiossidante e può agire in sinergia con altri antiossidanti come il glutatione, l'acido ascorbico e il tocoferolo. Esso può anche avere proprietà pro-ossidanti; ad esempio, è in grado di ridurre lo ione ferro e di generare radicali contenenti zolfo che possono danneggiare le proteine (Valko et al., 2006).

Altre molecole implicate nel processo di detossificazione dai radicali liberi sono la melatonina, i carotenoidi e i flavonoidi.

La melatonina è un neuro-ormone sintetizzato principalmente dalla ghiandola pineale ed ha molti effetti su un largo numero di funzioni fisiopatologiche. È un forte antiossidante che può facilmente attraversare le membrane cellulari e la barriera ematoencefalica (Reiter et al., 1997). La funzione principale della melatonina è quella di spazzare i radicali liberi prodotti durante il metabolismo dell'ossigeno. A differenza di altri antiossidanti, la melatonina non percorre un ciclo redox che le consentirebbe di agire come proossidante e promuovere la formazione di radicali liberi. Per tale motivo, la melatonina, una volta ossidata, non può più essere ridotta al suo stato precedente in quanto, dopo aver reagito con i radicali liberi, forma numerosi prodotti finali stabili. Per questo motivo, la melatonina è definita un antiossidante terminale (Tane et al., 2000).

I carotenoidi rappresentano una classe di pigmenti presenti nelle piante e in diversi microrganismi. Studi epidemiologici hanno rilevato che un incremento del consumo di carotenoidi, attraverso la dieta, diminuisce il rischio di sviluppare malattie età-dipendenti.

Questo è correlato con la capacità dei carotenoidi di eliminare fisicamente l'ossigeno singoletto senza degradarlo e di reagire chimicamente con i radicali liberi. Possono anche spazzare i perossidi prevenendo così il danno a livello di compartimenti lipofilici (Rahaman, 2000). La concentrazione dei carotenoidi e la pressione parziale dell'ossigeno sono fattori importanti nell'esplicazione della funzione antiossidante; in particolare il β -carotene esibisce proprietà antiossidanti a pressioni parziali dell'ossigeno basse, ma diventa un pro-ossidante ad elevate pressioni dell'ossigeno ed ad alte concentrazioni di carotenoidi (Rahaman, 2000). Infine ricordiamo i flavonoidi, composti polifenolici, metaboliti secondari delle piante, che rappresentano una parte integrale della dieta umana (Valko et al., 2006). I flavonoidi suscitano particolare interesse grazie alle loro proprietà antiossidanti, alla loro capacità di chelare i metalli e al possibile ruolo svolto nella prevenzione di malattie croniche ed età-dipendenti (Rahaman, 2007). Le proprietà biologiche dei flavonoidi dipendono dall'estensione, dalla natura, dalla posizione dei gruppi sostitutivi e dal numero di gruppi idrossilici; inoltre, questi fattori determinano se un flavonoide avrà azione antiossidante o sarà un modulatore dell'attività enzimatica o se possiederà proprietà antimutagene o citotossiche. L'attività più studiata dei flavonoidi è quella di protezione dell'organismo contro lo stress ossidativo. Per esempio, i flavonoidi sono spazzini ideali dei perossidi e sono degli effettivi inibitori della perossidazione lipidica, possono chelare gli ioni metallici e prevenire così la rottura del perossido di idrogeno. Comunque, in determinate condizioni, i flavonoidi possono mostrare anche un'attività pro-ossidante e si pensa che questa sia direttamente proporzionale al numero totale di gruppi idrossilici (Valko et al., 2006).

2.4 Stress ossidativo, invecchiamento e malattie neurodegenerative.

Lo stress ossidativo svolge un ruolo cruciale sia durante il normale processo di invecchiamento (Jha et al., 2009) che nella patogenesi di diverse malattie come le neoplasie, l'ischemia e le malattie neurodegenerative (Butterfield et al., 2007).

Oggi si sta dedicando sempre maggiore attenzione alla comprensione dei fattori che sono alla base del processo di invecchiamento cellulare (Govoni et al., 2001), che potrebbero aiutare a comprendere le patologie involutive e degenerative che si possono manifestare in età avanzata a carico di diversi organi e apparati. In questo contesto assumono particolare importanza, per la frequenza e per il carico di disabilità che comportano, i processi neurodegenerativi dell'encefalo. L'espressione delle alterazioni e del danno varia da modificazioni modeste delle principali funzioni dei neurotrasmettitori e metaboliche, che

portano a compromissione della funzionalità neuronale, fino a modificazioni morfologiche micro- e macroscopiche della struttura stessa dell'encefalo (Govoni et al., 2001).

I precisi meccanismi molecolari alla base di tali processi non sono ancora del tutto noti e soprattutto non è nota la loro sequenza temporale, la gerarchia e la soglia tra fisiologia e patologia (Govoni et al., 2001). Da qui l'incertezza sull'eziopatogenesi dei processi neurodegenerativi che deve essere considerata eterogenea e multifattoriale. Tutto questo ha portato a formulare diverse ipotesi di lavoro dirette su più fronti spesso trasversali a più patologie. La domanda di fondo è rivolta a sapere se i meccanismi di neurodegenerazione, che vengono di volta in volta individuati, siano specifici per una patologia o comuni a più di esse. Una di queste ipotesi, trasversale all'invecchiamento e a più stati patologici, associa l'accumulo di danno ossidativo con la perdita di funzionalità (Govoni et al., 2001).

Recentemente, si è osservato un crescente interesse nel capire il ruolo che lo stress ossidativo svolge nella patogenesi dei disordini neurologici. Vi è una marcata evidenza che i radicali liberi sono implicati nello sviluppo della malattia da ischemia-riperfusion, della malattia di Parkinson (PD), della Sclerosi Laterale Amiotrofica (ALS), della sindrome di Down (DS) e della malattia di Alzheimer (AD) (Markesbery, 1996).

Tessuti diversi presentano differente suscettibilità allo stress ossidativo; è ormai noto da tempo che il sistema nervoso centrale (CNS) è particolarmente vulnerabile al danno da radicali liberi per diverse ragioni che includono una limitata efficacia del sistema antiossidante e un elevato consumo di ossigeno per produrre energia. Inoltre, il tessuto cerebrale, se confrontato con altri tessuti, presenta un abbondante contenuto lipidico, in particolar modo acidi grassi polinsaturi (PUFAs) i quali sono altamente suscettibili al processo di perossidazione lipidica (Markesbery, 1996; Mariani et al., 2005; Lovell et al., 2007).

Come precedentemente spiegato, lo stress ossidativo è il risultato di una incontrollata produzione di ROS o RNS che altera la struttura di lipidi, proteine ed acidi nucleici (Sekler et al., 2008).

La comprensione del danno ossidativo a livello degli acidi nucleici si deve a Mecocci e coll. che, nel 1993, hanno studiato l'ossidazione di specifiche basi del DNA (Lovell et al., 2007).

Un buon marcatore biologico di stress ossidativo a livello del DNA è rappresentato dall'8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) (Shen et al., 2006).

La deossiguanosina (dG) è uno dei costituenti del DNA e se ossidata si trasforma in 8-OHdG. L'analita viene tagliato da enzimi, le endonucleasi, del sistema di riparazione del DNA. Se il DNA non venisse correttamente riparato prima del meccanismo di replicazione,

la presenza dell' 8-OHdG condurrebbe alla trasversione da G:C a T:A, mutagenesi o morte cellulare (Shen et al., 2006).

Con l'invecchiamento i livelli di questa base nucleotidica modificata aumentano sia a livello del DNA nucleare (n-DNA) che del DNA mitocondriale (mt-DNA) (Mariani et al., 2005).

Inoltre è stato riscontrato che il mt-DNA sembra essere più soggetto al danno rispetto al n-DNA (Mariani et al., 2005); infatti, analisi dei tessuti cerebrali *post mortem* mostrano un incremento di 8-OHdG di 10-15 volte nel mt-DNA rispetto al n-DNA (Allen et al., 1994).

È stato postulato che il danno a livello del mt-DNA potrebbe essere una causa del danneggiamento delle funzioni mitocondriali che, a loro volta, portano ad una ridotta attività metabolica (Govoni et al., 2001).

Le modificazioni della funzionalità del mitocondrio possono essere messe in relazione anche con le principali patologie neurodegenerative. Nei soggetti affetti da malattia di Alzheimer (AD) si è misurata una diminuzione del 25-30% dell'attività della citocromo ossidasi in diverse regioni cerebrali; un calo del 50% è stato invece riscontrato in mitocondri purificati da tessuto cerebrale di pazienti AD (Govoni et al., 2001).

Studi su tessuto cerebrale *post mortem* di pazienti in età avanzata e con malattie neurodegenerative hanno mostrato un notevole incremento di altri marker tipici del danno ossidativo quali la perossidazione lipidica, l'ossidazione delle proteine e la glicossidazione (Mariani et al., 2005).

Ad esempio, è stato osservato un aumento dei livelli di malonildialdeide (MDA) e del 4-idrossi-2-nonenale (HNE), due aldeidi della perossidazione lipidica. Queste due molecole risultano essere aumentati in diverse regioni cerebrali sia di soggetti sani in età senile che in individui affetti da malattie neurodegenerative (Mariani et al., 2005).

Circa il ruolo dell'ossidazione delle proteine si può asserire che le specie reattive dell'ossigeno possono interagire con residui amminoacidici, in particolare istidina, arginina e lisina, formando funzioni carboniliche. Alcuni ricercatori hanno rilevato che i livelli cerebrali di questi composti aumentano con l'invecchiamento senza tuttavia notare una significativa differenza tra i tessuti provenienti da soggetti anziani e tessuti di pazienti AD. Studi successivi, tuttavia, indicherebbero una maggior presenza di carbonilproteine nell'ippocampo e nel lobulo parietale inferiore del cervello di pazienti affetti da AD (Govoni et al., 2001).

L'eccessiva glicossidazione delle proteine potrebbe rappresentare un evento precoce della degenerazione cellulare. I monosaccaridi possono indurre una modificazione irreversibile delle proteine mediante due distinti meccanismi: il primo consiste nella formazione di

radicali liberi in presenza di metalli di transizione e ciò potrebbe originare gruppi carbonilici reattivi, il secondo prevede il coinvolgimento di una glicazione non enzimatica che si traduce nella formazione di composti stabili noti come composti finali di glicazione o AGE (Govoni et al., 2001). Recentemente, maggiore attenzione è stata posta sul fenomeno della modificazione delle proteine da parte dei composti AGE. Tali proteine modificate sembrerebbero in grado di legarsi a recettori specifici presenti in diverse linee cellulari con conseguente aumento della produzione di specie radicaliche dell'ossigeno. Usando anticorpi specifici è stato possibile colocalizzare questi composti con la proteina tau iperfosforilata nei gomitoli neurofibrillari e placche neuritiche presenti nell'encefalo di pazienti affetti da AD (Govoni et al., 2001).

2.5 La malattia di Alzheimer.

La malattia di Alzheimer (AD) è una patologia neurodegenerativa, irreversibile e progressiva, che distrugge lentamente la memoria e le abilità cognitive (Irvine et al., 2008) con alterazione della personalità e del comportamento.

Il nome della malattia si deve ad Alois Alzheimer, un medico tedesco che, nel 1907, descrisse le principali caratteristiche riscontrate, a livello cerebrale, in una donna di 51 anni affetta da demenza progressiva. L'autopsia di questa paziente ha permesso di rilevare due tipi di formazioni caratteristiche: le placche senili (SP), che si depositano a livello extracellulare, e depositi di aggregati neurofibrillari (NFT) a livello intracellulare (Markesbery, 1996), come mostrato nella figura sottostante.

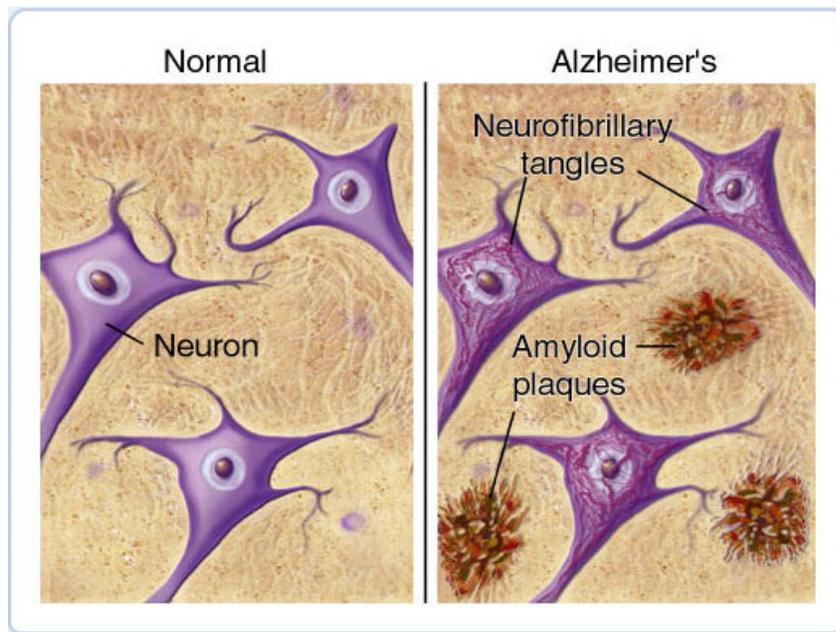


Figura 5. *La formazione delle placche senili e dei grovigli neurofibrillari contribuiscono alla degradazione dei neuroni e al successivo sviluppo della malattia di Alzheimer (da: www.ahaf.org/.../plaques-and-tangles.html).*

Per questo motivo, in quest'ultima decade, sono stati studiati i principali meccanismi in cui sono coinvolti due elementi fondamentali: il peptide β -amiloide ($A\beta$), il costituente principale delle SP, conosciute anche con il nome di placche amiloidi, e la proteina tau (τ) che costituisce gli NFT (Sorbi et al., 2004).

L'AD è considerata la più comune causa di demenza ed attualmente colpisce più di 24 milioni di persone nel mondo, con 4.6 milioni di nuovi casi ogni anno (Irvine et al., 2008). Il prolungamento della vita media e l'avanzamento delle tecniche diagnostiche, giustificano l'aumento del numero di casi rilevati negli ultimi anni.

La patologia inizialmente si manifesta con alcuni sintomi premonitori tra i quali ricordiamo perdita di memoria, difficoltà nelle attività quotidiane, problemi di linguaggio, disorientamento nel tempo e nello spazio, diminuzione della capacità di giudizio, difficoltà nel pensiero astratto, cambiamenti di umore, di comportamento, di personalità e mancanza di iniziativa. In una seconda fase l'amnesia diviene più pronunciata e si accompagna a segni di agnosia (difficoltà nel riconoscere le persone), aprassia (difficoltà nel movimento) ed afasia (deterioramento del linguaggio), nonché disturbi nelle funzioni esecutive (Kidd, 2005). La fase terminale può sopraggiungere, nei casi più gravi, dopo soli tre anni, ma, in generale, giunge circa dopo venti anni dall'esordio; in questo stadio della malattia si assiste ad una disintegrazione delle funzioni vitali, apatia ed inerzia cui segue la morte per patologie collaterali, quali quelle a carico dell'apparato respiratorio.

Tra i fattori di rischio identificati si annoverano l'età, i fattori genetici, in alcune famiglie l'AD si presenta come malattia genetica dominante, ed i traumi cranici subiti ad un'età superiore ai cinquant'anni. Tra questi, l'età rappresenta sicuramente il maggiore fattore di rischio conosciuto; colpisce più del 5% degli individui tra i 60 e i 65 anni di età; questa percentuale aumenta rapidamente al 19% dopo i 75 anni e al 30% dopo gli 85 anni di età (Lambert et al., 2007).

La malattia può essere distinta in forme sporadiche e forme familiari. Nelle forme sporadiche, che rappresentano la maggioranza dei casi (circa il 75%), un solo membro della famiglia sviluppa la malattia; nelle forme familiari (il restante 25% dei casi) più individui all'interno della stessa famiglia, possono sviluppare l'AD. Le forme familiari, a loro volta, si possono suddividere in:

1. forme familiari ad insorgenza precoce (nell'1%-6% dei casi): la malattia si manifesta prima dei 60-65 anni di età;
2. forme familiari ad insorgenza tardiva (nel 60% dei casi): la malattia si manifesta dopo i 65 anni di età (Bird, 2008).

Lo studio di queste ultime forme di AD, che presentano una modalità di trasmissione di tipo autosomica-dominante, ha permesso di ottenere importanti informazioni sulla malattia; nelle forme familiari, infatti, sono stati identificati alcuni geni che, se mutati, possono causare l'AD. Tre di questi geni sono implicati nelle forme familiari ad insorgenza precoce e

codificano per la proteina precursore dell'amiloide (APP), la presenilina 1 (PSEN-1) e la presenilina 2 (PSEN-2) (Christen, 2000; Bird, 2008).

Il gene *app*, localizzato sul cromosoma 21, se mutato porta ad un aumento della produzione della APP; le mutazioni a livello di questo gene sono rare. In particolare, sono state descritte 23 mutazioni, 19 delle quali causano, inequivocabilmente, AD o altre forme di demenza associate ad emorragie cerebrali; queste mutazioni sono state trovate tutte a livello del sito di taglio delle secretasi, enzimi coinvolti nel metabolismo dell'APP e nella produzione della A β che tende a depositarsi a livello cerebrale sottoforma di placche senili. (Lambert, 2007).

Il gene *psen-1* è situato sul cromosoma 14; sono state identificate circa 150 mutazioni che rappresentano la causa più comune dell'AD familiare ad esordio precoce (con età di insorgenza tra i 28 e i 60 anni). È oggi noto che la PSEN-1 fa parte del cuore catalitico del complesso delle γ -secretasi, enzimi che hanno la funzione di tagliare la proteina amiloide; una mutazione a livello di questo gene porta all'accumulo della proteina amiloide A β_{1-42} (Lambert, 2007).

Il gene *psen-2* è localizzato sul cromosoma 2. Sono state descritte 9 mutazioni che, come le mutazioni del gene *psen-1*, sono funzionalmente associate con un incremento della produzione del peptide A β_{1-42} (Lambert, 2007).

Oltre a questi, il gene dell'apolipoproteina E (*apo E*), localizzato sul cromosoma 19, è geneticamente associato con un aumento del rischio di insorgenza della AD sia nelle forme sporadiche che familiari (Christen, 2000).

L'APO E è una proteina plasmatica coinvolta nel trasporto del colesterolo, che si lega alla proteina amiloide (Mohands et al., 2009); esistono tre forme: APO ϵ_2 , APO ϵ_3 , APO ϵ_4 codificate da tre alleli diversi (ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4). L'allele ϵ_4 è presente con maggiore frequenza nei soggetti affetti da AD; questo dato ha fatto ipotizzare che la presenza del genotipo ϵ_4 determina un aumento del rischio, di circa tre volte, di sviluppare la malattia nelle forme familiari ad esordio tardivo e nelle forme sporadiche. Il genotipo APO ϵ_2 avrebbe, invece, un effetto protettivo nei confronti della malattia (Migliore et al, 2005).

Se da un lato l'età e la predisposizione genetica rappresentano i maggiori fattori di rischio di sviluppo della patologia, l'AD è il risultato dell'interazione di diversi fattori, non solo genetici, ma anche ambientali; per tale motivo tale malattia è spesso definita una complessa patologia multifattoriale (Lambert, 2007). In tal senso, i fattori genetici, lo stress ossidativo, le disfunzioni dell'omeostasi del calcio, la disregolazione dei fattori ormonali, infiammatori, vascolari e del ciclo cellulare, possono interagire tra loro e determinare lo sviluppo dell'AD (Mohands et al., 2009).

2.5.1 Ipotesi della cascata amiloidea.

Secondo l'ipotesi amiloidea, la proteina β -amiloide ($A\beta$), che deriva dal taglio proteolitico della proteina precursore dell'amiloide (APP), svolge un ruolo centrale nella patogenesi dell'AD. In particolar modo, una serie di proteasi, l' α -, la β - e la γ -secretasi, tagliano la APP e conducono alla formazione dell'amiloide.

La APP appartiene ad una grande famiglia di proteine di membrana di tipo I con un largo dominio extracellulare ed una piccola regione citoplasmatica (come mostrato nella figura sottostante) che deriva dallo splicing alternativo di un gene di trascrizione localizzato sul braccio lungo del cromosoma 21 (Mohands et al., 2009).



Figura 6. *Struttura e tipologia dell'APP (modificata da The Journal of Clinical Investigation Gandy, 2005).*

La generazione della $A\beta$, a partire dal suo precursore, è illustrata in figura 7.

La APP matura è metabolizzata attraverso 2 vie che competono tra loro:

1. la via non amiloidogena dell' α -secretasi, un enzima che taglia all'estremità amminoterminale (N-terminale) dell'APP, generando un frammento N-terminale solubile ($sAPP_\alpha$) e un frammento carbossiterminale (C-terminale) ancorato alla membrana, il CTF_α (anche conosciuto come C83);
2. la via amiloidogena della β -secretasi, enzima conosciuto anche con il nome di BACE (β -APP-site cleaving enzyme), che taglia l'APP a livello dell'estremità N-terminale generando il frammento $sAPP_\beta$ e il frammento C-terminale CTF_β (conosciuto anche come C99).

Il taglio di alcune β -secretasi può essere spostato di dieci residui amminoacidici, generando il frammento $sAPP_\beta$ e il frammento CTF_β' (o C89) (Gandy, 2005).

Tutti i frammenti C-terminali (C83, C99 e C89) sono dei substrati per la γ -secretasi, un enzima multiproteico ad alto peso molecolare ($>10^6$ KDa) costituito dalla proteina

presenilina (PS), associata ad altre componenti quali la nicastrina, l'APH-1 e la PEN-2 (Gandy, 2005), come mostrato in figura 8.

Quando la γ -secretasi agisce sul frammento C83 porta alla formazione del dominio intracellulare dell'APP (AICD) e del peptide p3 (non mostrato in figura), l'azione della secretasi a livello del frammento C99 porta alla formazione del AICD e della $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$, mentre l'azione dell'enzima sul frammento C89 porta alla formazione del AICD e $Glu^{11}A\beta$, (Gandy, 2005) come mostrato in figura 9.

A livello delle placche amiloidee, si possono riscontrare entrambe i tipi di $A\beta$, ma la proteina $A\beta_{1-42}$ ha un'azione fortemente neurotossica ed ha una maggiore tendenza ad aggregarsi rispetto alla forma $A\beta_{1-40}$ (Mohandas et al., 2009).

In condizioni normali, circa il 90% del peptide $A\beta$ secreto è $A\beta_{1-40}$, che risulta essere la forma solubile del peptide che solo lentamente converte ad una configurazione β -sheet insolubile e, per tale motivo, può essere prontamente eliminata dal cervello. Al contrario, circa il 10% del peptide $A\beta$ secreto è $A\beta_{1-42}$, che tende ad aggregarsi facilmente e a depositarsi precocemente a livello cerebrale in individui con AD e Sindrome di Down (Mohandas et al., 2009).

A livello intracellulare, la $A\beta$ è presente sottoforma di monomeri, oligomeri, protofibrille e fibrille; mentre i primi non mostrano azione patogena, gli altri possono facilitare l'iperfosforilazione della proteina τ , la distruzione del proteosoma e delle funzioni mitocondriali, la disregolazione dell'omeostasi del calcio, la perdita delle sinapsi, la diminuzione del rilascio di neurotrasmettitori (in particolare acetilcolina) ed infine, possono condurre alla morte dei neuroni (Mohandas et al., 2009).

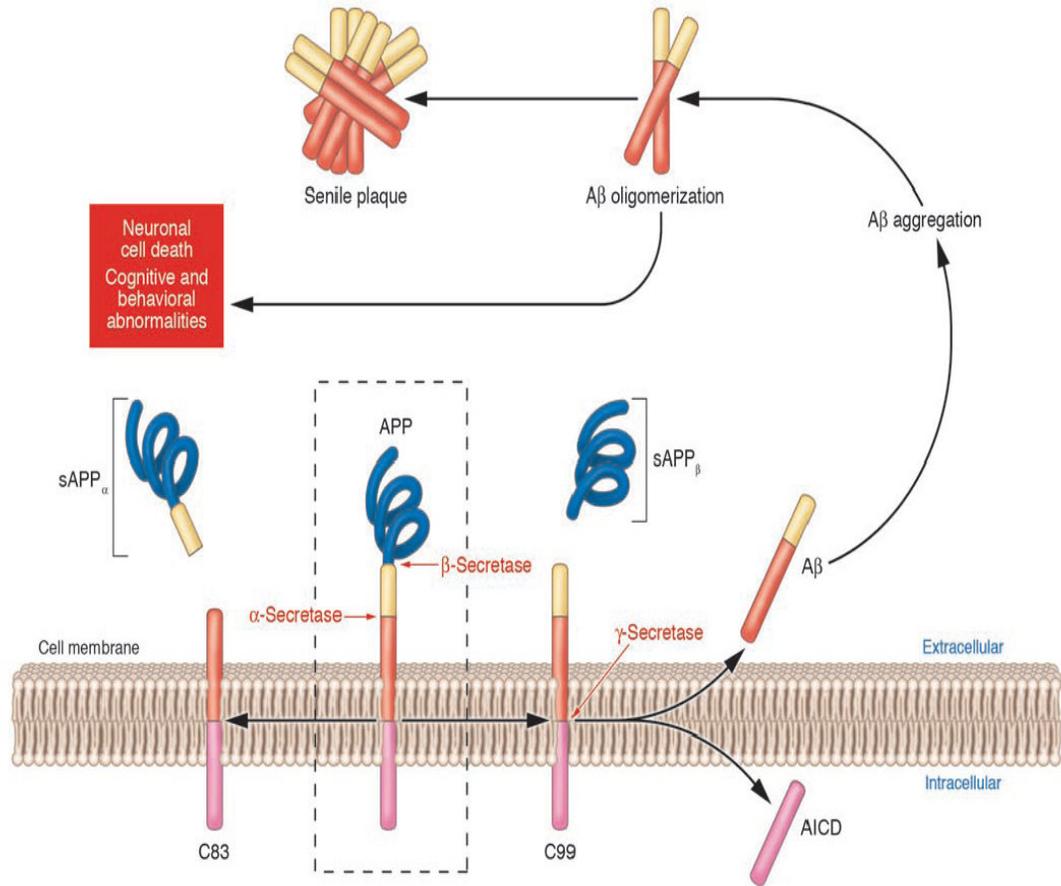


Figura 7. Azione delle secretasi sulla APP e accumulo del peptide Aβ (da *The Journal of Clinical Investigation* Gandy, 2005).

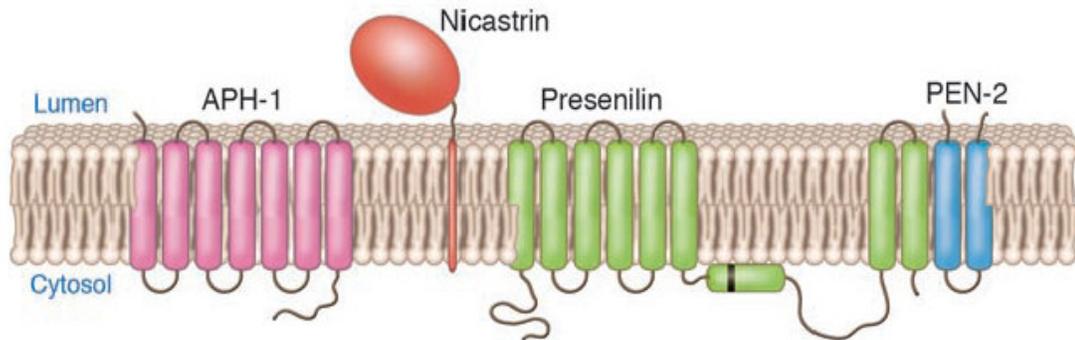


Figura 8. Rappresentazione del complesso della γ-secretasi (da *The Journal of Clinical Investigation* Gandy, 2005).

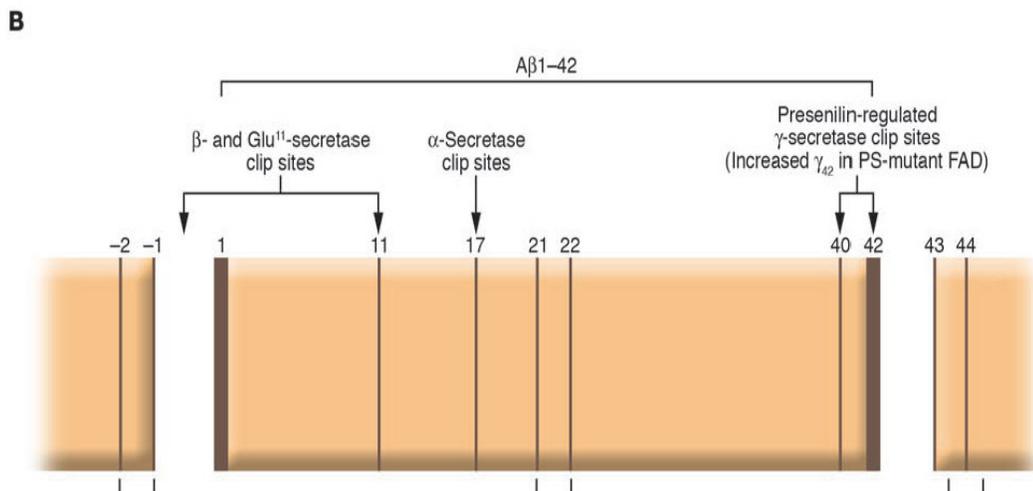


Figura 9. Rappresentazione della struttura fine del dominio Aβ e siti di taglio delle secretasi (modificata da *The Journal of Clinical Investigation* Gandy, 2005).

2.5.2 Ipotesi dell'iperfosforilazione della proteina tau.

Uno dei marker patologici che caratterizza l'AD è la presenza dei grovigli neurofibrillari intracellulari che contengono, come loro prima componente, aggregati della proteina tau (τ) in uno stato iperfosforilato (Clodfelder-Miller et al., 2006).

Nell'Uomo, il gene che codifica per la proteina τ è espresso sul cromosoma 17 (Bandyopadhyay et al., 2007). La τ è una proteina, altamente solubile, associata ai microtubuli; questi rappresentano lo scheletro interno dei neuroni e costituiscono il sistema di trasporto per le sostanze nutritive e chimiche. In condizioni fisiologiche, la proteina τ è strettamente legata ai lati dei microtubuli ed è necessaria per mantenerne la struttura; quando insorge la malattia di Alzheimer, le molecole di τ si staccano dai microtubuli e si uniscono formando i grovigli neurofibrillari, come mostrato in figura 10.

In pazienti affetti da AD la τ risulta essere iperfosforilata in tutte e sei le sue possibili isoforme (Mohandas et al., 2009). L'iperfosforilazione della proteina riduce la sua capacità di legarsi ai microtubuli, i quali si disgregano con conseguente sequestro della τ normale, delle MAP-1 (proteine associate ai microtubuli 1), delle MAP-2 e dell'ubiquitina nei grovigli neurofibrillari (Mohandas et al., 2009). Questi ultimi sono in grado di indurre i microtubuli al collasso, di interferire con il trasporto assonale e, in ultima analisi, di condurre a

disfunzione delle sinapsi, degenerazione dei neuroni e decadimento cognitivo (Clodfelder-Miller et al., 2006).

Recenti scoperte (Fasulo et al., 2005) hanno messo in luce che, nell'AD, le modificazioni della proteina τ non sono dovute a mutazioni nel gene che codifica per la proteina, come avviene in altri tipi di demenze (ad esempio nelle demenze fronto-temporali); in effetti, i livelli di espressione del RNA messaggero trascritto dal gene τ non cambiano. Quindi, le modificazioni associate alla malattia potrebbero instaurarsi dopo che la proteina τ è già stata “costruita” dal DNA, ovvero nei cosiddetti processi post-traduzionali (Fasulo et al., 2005).

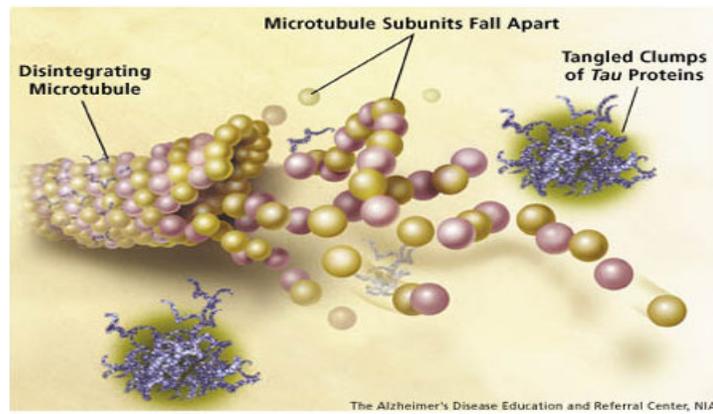


Figura 10. *Meccanismo di formazione dei grovigli neurofibrillari. (da www.psicozoo.it/.../alzheimer-una-speranza-ce/)*

2.5.3 Ipotesi dello stress ossidativo.

Molte delle ricerche sull'AD si focalizzano sul meccanismo dello stress ossidativo e sulla sua importanza nella patogenesi della malattia. Molteplici evidenze suggeriscono che lo stress ossidativo e il danno da radicali liberi sono implicati nella patogenesi e nell'eziologia dell'AD (Perry et al., 2002).

La prima evidenza a sostegno dell'ipotesi dello stress ossidativo nell'AD si basa sulla scoperta che i metalli sono responsabili della maggior parte della produzione dei radicali liberi. Gli elementi chimici di maggior interesse nell'AD sono il ferro (Fe), l'alluminio (Al), il mercurio (Hg), il rame (Cu) e lo zinco (Zn). Il Fe è implicato nella formazione del radicale idrossile, il quale ha effetti deleteri come descritto dalla reazione di Fenton e di Haber-Weiss (Christen, 2000).

Diversi studi hanno evidenziato un'alterazione del metabolismo del Fe nell'encefalo di pazienti AD (Markesbery, 1996; Christen, 2000). Mediante tecniche di istochimica, è stato riscontrato un incremento dei livelli di Fe nella corteccia cerebrale di soggetti affetti dalla malattia; in particolar modo è stato osservato che la distribuzione del Fe rispecchia la distribuzione delle SP e dei NFT, i due elementi chiave della AD. Ferro, ferritina e transferrina sono stati trovati nelle SP dei pazienti AD e la ferritina è presente nella microglia in associazione con le SP nell'AD. Uno studio effettuato da Kennard e collaboratori, nel 1996, ha mostrato, nei pazienti AD, un'elevata concentrazione, nel fluido cerebrospinale e nel plasma, della proteina p 97, una proteina di legame del Fe, la quale potrebbe rappresentare un marker della patologia (Markesbery, 1996; Christen, 2000).

Risultati contrastanti sono stati trovati circa il coinvolgimento dell'Al nella patologia, infatti, mentre alcuni studi riscontrano un aumento di questo metallo nell'encefalo di pazienti con AD, altri studi non confermano tale osservazione (Markesbery, 1996; Christen, 2000).

La possibilità del coinvolgimento del Cu nell'AD è supportata dal fatto che lo ione può agire come catalizzatore della produzione di ROS, ed è stato messo in evidenza che molecole di APP contengono siti di legame per il Cu. L'APP riduce il Cu^{2+} a Cu^{+} e questo potrebbe accrescere la produzione di $\cdot\text{OH}$ che, a sua volta, condurrebbe a danno neuronale. In effetti, questo metallo è essenziale nell'attività di molti enzimi tra cui la citocromo c ossidasi (COX) e la superossido dismutasi rame/zinco (Cu/Zn SOD). Recenti studi mostrano basse concentrazioni del Cu in cinque regioni del cervello di pazienti AD, particolarmente a livello di ippocampo e amigdala (Markesbery, 1996; Christen, 2000).

L'ultimo metallo citato come possibile fattore dello sviluppo dell'AD è lo Zn, il quale induce una rapida colorazione delle placche amiloidi nell'uomo, ma no nel ratto. La APP lega lo Zn^{2+} e questo legame modula le proprietà funzionali dell'APP (ad esempio inibisce il taglio dell'APP da parte delle α -secretasi) (Christen, 2009).

Diversi marker di danno ossidativo a livello di DNA, lipidi e proteine sono stati largamente studiati nella malattia di Alzheimer. Un incremento significativo dei livelli di 8-OHdG è stato riscontrato a livello del n-DNA e del mt-DNA di pazienti affetti da AD. Tale aumento è maggiore nel mt-DNA rispetto al n-DNA, mostrando un'elevata suscettibilità dei mitocondri allo stress ossidativo (Mariani et al., 2005).

I pazienti affetti da AD presentano, a livello cerebrale, un incremento della perossidazione lipidica particolarmente a livello del lobo temporale, dove le alterazioni istopatologiche sono ben visibili. Queste osservazioni comunque non sono confermate da altri studi, i quali falliscono nel tentativo di trovare altre differenze nei livelli basali di perossidazione lipidica.

L'incoerenza di questi risultati, è da attribuire al genotipo Apo E. I pazienti che portano l'allele ε4 sono probabilmente più suscettibili alla perossidazione lipidica rispetto a coloro che non hanno tale allele (Christen, 2009).

La perossidazione lipidica è stata quantificata anche saggiando i livelli delle sostanze reattive per l'acido tiobarbiturico (TBARS), del 4-idrossi-2-nonenale (HNE) e del F₂-isoprostano che aumentano nelle regioni cerebrali dei pazienti affetti da AD, a differenza dei livelli di MDA che non risultano significativamente elevati se confrontati con i controlli.

I TBARS risultano incrementati a livello della corteccia frontale e temporale dei pazienti AD ed anche i livelli del F₂-isoprostano risultano molto più alti nel fluido cerebrospinale dei pazienti rispetto ai controlli (Mariani et al., 2005).

Il fenomeno della lipoperossidazione potrebbe avere una maggiore influenza sulla patogenesi della malattia o addirittura esserne la causa (Christen, 2009).

Molto importante è l'effetto che le ROS hanno sui fosfolipidi di membrana; alterazioni a livello di queste strutture possono essere specifiche della patogenesi della malattia. È stato mostrato che la perossidazione lipidica è la causa maggiore di deplezione dei lipidi di membrana nell'AD. Uno dei prodotti della perossidazione lipidica, l'HNE che è stato trovato in alte concentrazioni nei pazienti AD, è risultato essere tossico in cellule di ippocampo in coltura (Christen, 2009).

Riguardo l'ossidazione proteica, è stato riscontrato che non ci sono differenze nei livelli delle proteine ossidate nel tessuto cerebrale di pazienti AD se confrontato con normali controlli anziani (Mariani et al., 2005).

2.5.4 Neuropatologia della malattia di Alzheimer.

La ricchezza delle conoscenze ad oggi disponibili sulla biologia molecolare della proteina τ e della Aβ, tende a far passare in secondo piano l'importanza che la neuropatologia assume nello sviluppo della malattia; a questo proposito è importante ricordare alcuni problemi. Nello studio dell'AD, è stato riscontrato che le aree cerebrali dove si registra il maggior accumulo delle placche amiloidi sono la corteccia temporale, la corteccia parietale e l'ippocampo, che sono aree associate con le funzioni della memoria e dell'apprendimento (Castellani et al., 2009). Dopo questa descrizione iniziale, è stato riscontrato che le placche e i NFT non sono presenti solo nell'encefalo di individui affetti dalla malattia, ma anche di individui anziani che non mostrano segni di demenza (Castellani et al., 2009).

In effetti, la semplice presenza o assenza delle placche senili e dei NTF, non è determinante dal punto di vista diagnostico; è necessario determinare la quantità di placche e grovigli e, soprattutto, la presenza dei segni clinici di demenza (Castellani et al., 2009).

In realtà diagnosi certa di AD può essere effettuata solo *postmortem*, al momento dell'autopsia (Mosconi et al., 2009), la quale rileva, a livello dell'encefalo, cambiamenti molto estesi, incluso l'atrofia che porta a dilatazione delle cavità ventricolari e, a livello della corteccia, ad allargamento dei solchi e assottigliamento delle circonvoluzioni. La massa cerebrale è ridotta ad un terzo a causa di una significativa perdita delle cellule nervose, sinapsi e dendriti che, a sua volta, porta a distruzione di specifici circuiti cerebrali, come mostrato nella figura sottostante (Kidd, 2008).

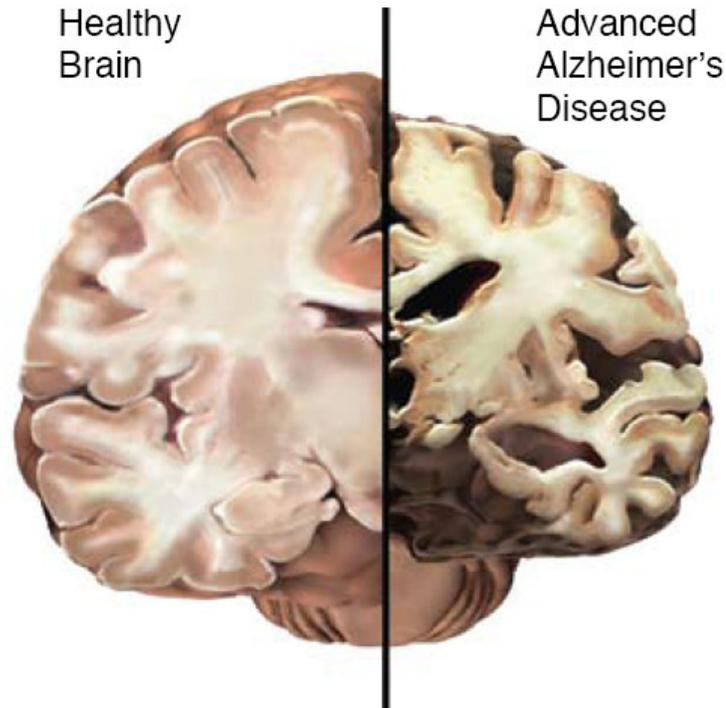


Figura 11. *Encefalo sano (a sinistra) ed encefalo affetto da AD (a destra).* (da Kidd, 2008)

Una serie di studi (Morris et al., 1996; Price et al., 2001) prova l'evidenza che anche se l'aumentare dei depositi di $A\beta$ e dei grovigli neurofibrillari correla con lo stadio clinico, la perdita neuronale è il reale punto di svolta per lo sviluppo dei sintomi clinici di demenza in vita (Mosconi et al, 2009).

Le aree più vulnerabili del cervello dove si registra un pronunciato processo neurodegenerativo sono i lobi temporali mediali (MTL) con particolare interessamento dell'ippocampo, della corteccia entorinale (ERC) e della circonvoluzione paraippocampica. Nella neocortex, le cellule piramidali anatomicamente connesse alla ERC e alla regione CA1 dell'ippocampo sono particolarmente suscettibili alla formazione dei NFT e alla neurodegenerazione. Si pensa che la distruzione dei neuroni piramidali nella via perforante disconnetta l'ippocampo dal resto della corteccia, contribuendo fortemente al declino della memoria osservata negli stadi iniziali dell'AD. Nonostante una predilezione della neocortex, depositi di A β si riscontrano anche nei MTL a stadi più tardivi della malattia (Mosconi et al, 2009).

Una caratteristica costante dell'AD è la perdita delle cellule colinergiche del prosencefalo basale; in queste regioni è stata riscontrata una diminuzione di marcatori colinergici, tra cui l'acetilcolina, la noradrenalina, la serotonina, la dopamina, il glutammato (Mohandas et al., 2009). Le manifestazioni cliniche della malattia sono dunque probabilmente dovute alla diminuzione di questi neurotrasmettitori. A tale scopo, sono stati somministrati farmaci che incrementano l'attività colinergica attraverso l'inibizione dell'acetilcolinesterasi (AChE), un enzima che provoca la scissione dell'acetilcolina (ACh) nelle sue due costituenti, acetile e colina. Tali farmaci, conosciuti come inibitori dell' AChE (AChEI) producono un modesto, ma utile beneficio comportamentale e cognitivo in alcuni degli individui affetti da AD (Bird, 2009).

Negli ultimi anni è stato proposto, per il trattamento dell'AD, sia in uno stadio moderato che severo, l'uso di una nuova classe di farmaci nella quale troviamo la memantina. Si tratta di un antagonista non competitivo del recettore per l'N-metil-D-aspartato (NMDA), il recettore che viene attivato dal glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio a livello di corteccia cerebrale e ippocampo, le regioni cognitive e della memoria (Rountree et al., 2009).

Nei soggetti affetti da demenza, la perdita di neuroni corticali sembra essere correlata ad una aumentata sensibilità o ad aumentati livelli di glutammato. Questo determina un flusso continuo di calcio all'interno dei neuroni, responsabile della morte delle cellule (fenomeno definito eccitotossicità). In questi pazienti, la memantina eserciterebbe la sua azione controllando la concentrazione del glutammato. Questo spiegherebbe l'apparente contraddizione insita nel suo meccanismo d'azione: mentre nei soggetti sani l'antagonismo nei confronti del recettore per l'NMDA può inibire l'apprendimento e la memoria a lungo

termine, nei pazienti affetti da demenza il farmaco contrasta la sovrastimolazione glutammatergica che danneggia i neuroni (Rountree et al., 2009).

2.5.5 Biomarcatori della malattia di Alzheimer.

Le ricerche di biomarker per l'AD sono condotte attraverso studi che hanno lo scopo di valutare le concentrazioni del peptide A β e della proteina τ a livello del fluido cerebrospinale (CSF) ad ogni stadio della malattia (Sonnen et al., 2009).

Molti studi hanno evidenziato che le concentrazioni di A β ₁₋₄₂, a livello del CSF di pazienti affetti dalla patologia, sono ridotte del 50% circa, rispetto ai soggetti di controllo (Sonnen et al., 2009). Se invece si analizzano i livelli di proteina τ si scopre che questi sono più elevati nei pazienti AD rispetto ai controlli; tuttavia, l'utilità di queste misurazioni per la diagnosi precoce della malattia rimane ancora poco chiara in quanto sono stati svolti pochi studi con lo scopo di correlare i livelli di A β e/o τ ad una diagnosi clinica (Kelly and Petersen, 2009).

Alcuni studi hanno messo in evidenza che, per diagnosticare l'AD, potrebbe essere utile analizzare la combinazione, a livello del CSF, sia delle concentrazioni di A β ₁₋₄₂ che di τ ed in particolare le specie di τ fosforilate a livello della treonina 181 o 231 (τ -P₂₃₁ o τ -P₁₈₁). Questi marker mostrano una percentuale di sensibilità pari all'85% ed una percentuale di specificità pari all'87%. Ciononostante, non è ancora chiaro se l'analisi quantitativa di questi marcatori aumentano l'accuratezza diagnostica nella pratica clinica dell'AD (Kelly and Petersen, 2009).

Un altro marker riscontrato nel CSF di pazienti affetti dalla malattia, l'AD7c-NTP (neuronal thread protein), ha mostrato alta sensibilità e specificità, ma a causa delle limitazioni tecniche e l'assenza di studi che ben delineano i pazienti, l'utilità delle misure quantitative di questo marker nel CSF o nell'urina è ancora poco chiaro (Kelly and Petersen, 2009).

2.6 Il decadimento cognitivo lieve.

Negli ultimi anni l'attenzione della ricerca scientifica e clinica nell'ambito della malattia di Alzheimer si è spostata sulla diagnosi precoce e, specialmente, sulla fase di transizione tra il normale processo invecchiamento e la demenza (Werner et al., 2008).

Sono stati proposti diversi termini per distinguere i soggetti affetti da lievi disturbi cognitivi età-correlati dai soggetti sani; questi includono il "benign senescent forgetfulness" (BSF), l'"age-associated memory impairment" (AAMI) (Werner et al., 2008), che è stato a lungo studiato e sembra essere verosimilmente un fenomeno dell'invecchiamento fisiologico, l'"age-related cognitive decline" (ARCD) e l'"age-associated cognitive decline" (AACD), che indicano un declino obiettivo nelle funzioni cognitive associato al processo di invecchiamento, ma entro i limiti normali dati dall'età del soggetto (Panza, 2001).

Oggi, il termine prevalentemente utilizzato per descrivere uno stadio intermedio tra l'invecchiamento cerebrale normale e la demenza è il "decadimento cognitivo lieve" (MCI, dalle iniziali inglesi di Mild Cognitive Impairment) (Werner et al., 2008; Chertkow, 2008).

Inizialmente, i criteri diagnostici per caratterizzare il MCI includevano: disturbo soggettivo di memoria, possibilmente confermato da un familiare, disturbo obiettivo di memoria, dimostrato con i test neuropsicologici, di entità superiore a quello che ci si aspetta dall'età e dal livello di educazione, integrità delle altre funzioni cognitive, conservata autonomia nella vita di tutti i giorni e, infine, assenza di demenza (Werner et al., 2008).

Successivamente, il concetto di MCI venne ampliato per includere un più largo spettro di condizioni; vennero così distinti diversi sottotipi di MCI:

1. il "MCI amnestico" (a-MCI), in cui il soggetto mostra disturbi nella memoria (Werner et al., 2008),
2. il "MCI non amnestico" (na-MCI), in cui il paziente ha disturbi in altri domini cognitivi, ad esempio nelle funzioni esecutive e nel linguaggio (Satler Diniz, 2008).

Entrambe i sottotipi di MCI possono, a loro volta, essere suddivisi in: "MCI single-domain", se l'individuo affetto presenta deficit cognitivi singoli diversi dalla memoria, "MCI multiple-domain", se presenta deficit cognitivi in più campi (Rosenberg et al., 2008), come mostrato in figura 12.

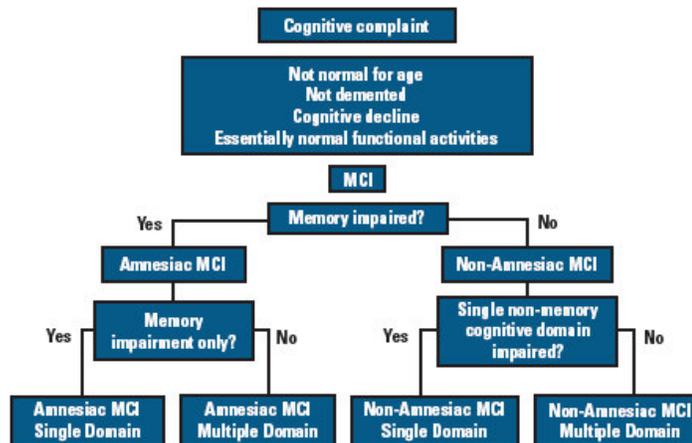


Figura 12. Rappresentazione schematica per la diagnosi e classificazione del MCI. (da Petersen e Negasi, CNS Spectr. Vol 13, No 1. 2008).

Uno dei principali fattori di rischio nell'insorgenza del decadimento cognitivo sembra essere l'età; è stato stimato che la tendenza a sviluppare MCI varia dal 15%, ad un'età inferiore ai 75 anni, al 30% ad un'età superiore agli 85 anni (Rosenberg et al., 2008).

Uno dei principali fattori di rischio nell'insorgenza del decadimento cognitivo sembra essere l'età; è stato stimato che la tendenza a sviluppare MCI varia dal 15%, ad un'età inferiore ai 75 anni, al 30% ad un'età superiore agli 85 anni (Rosenberg et al., 2008).

I dati che mettono in relazione la tendenza a sviluppare decadimento cognitivo con l'aumento dell'età variano a seconda del tipo di studio effettuato, in altre parole se si tratta di uno studio di popolazione o di uno studio clinico, e del sottotipo di MCI preso in esame. Ad esempio, se si prende in considerazione uno studio di popolazione, in cui vengono saggiati individui in età avanzata, si riscontra che i soggetti hanno una tendenza a sviluppare a-MCI pari al 3-6%, ma se si considera la tendenza che hanno a sviluppare tutti i diversi sottotipi di MCI, la percentuale aumenta al 16% circa (Rosenberg et al., 2008).

Diversi fattori possono concorrere ad aumentare il rischio di sviluppare MCI; tra questi, assumono maggiore importanza la presenza di malattie cardiovascolari, elevati livelli di colesterolo, l'apoplezia e la depressione; alcuni studi, anche se non sempre confermati. (Stephan, 2009).

I fattori genetici del MCI sono simili a quelli riscontrati per l'AD; il gene maggiormente associato allo sviluppo del MCI sembra essere l'apolipoproteina E (Apo E). Alcuni studi (Petersen et al., 1995; Tierney et al., 1996) suggeriscono che la presenza dell'allele ϵ può

predire una più alta percentuale di progressione verso uno stato di demenza. Comunque, questi dati risultano essere debolmente positivi e il genotipo Apo E non è, ad oggi, raccomandato come un criterio diagnostico o un indicatore prognostico nel MCI (Kelly and Peterson, 2009).

Si pensa che il MCI possa essere una patologia che precede l'insorgere della demenza, in particolar modo l'AD (Stephan, 2009); è stato messo in evidenza che individui affetti da MCI mostrano un aumentato rischio, 6.7 volte superiore, di sviluppare demenza rispetto ad un soggetto sano (Satler Diniz et al, 2008).

I pazienti affetti da MCI, approssimativamente dal 10% al 15% per anno, possono, in breve tempo, sviluppare demenza e dal 40 all'80% dei pazienti affetti da decadimento cognitivo sviluppa demenza nei successivi cinque, sei anni (Chertkow, 2008; Rosenberg et al., 2008). È stato riscontrato che nei pazienti affetti da MCI, che presentano solo un mite danneggiamento delle funzioni cognitive, un peggioramento della memoria verbale e delle funzioni esecutive aumenta il rischio che la patologia progredisca a demenza (Rosenberg et al., 2008). Inoltre, nei pazienti MCI, fattori quali la fibrillazione atriale e la presenza di bassi livelli di folati aumentano il rischio di sviluppare demenza (Stephan, 2009).

Sulla base di diversi profili neuropsicologici, è stato ipotizzato che i differenti sottotipi di MCI possono essere associati a varie conseguenze; mentre l'a-MCI single-domain può essere considerato uno stadio di pre-demenza, in particolare modo AD, il MCI multiple-domain può essere considerato un precursore sia delle demenze vascolari che dell'AD, inoltre, il na-MCI single-domain può essere riscontrato nelle fasi prodromiche di demenza frontotemporale, di demenza vascolare (VD), di demenza con Corpi di Lewy o anche nei disordini depressivi (Satler Diniz et al, 2008). Nonostante queste osservazioni, ci sono ancora dei punti da chiarire circa la specificità dei diversi sottotipi di MCI di aumentare il rischio di sviluppare demenza, basti pensare che tali studi non sono stati confermati da altri e, da un punto di vista concettuale, risultano essere molto semplicistici (Rosenberg et al., 2008).

Nonostante alcuni pazienti affetti da MCI possono sviluppare demenza, molte persone colpite da tale patologia possono rimanere stabili o mostrare solo un lento deterioramento cognitivo, inoltre, un numero sorprendente di pazienti, dal 17% al 32%, mostra un miglioramento spontaneo delle abilità cognitive (Werner et al., 2008; Rosenberg et al., 2008).

La migliore definizione dei quadri clinici e le osservazioni ricavate da studi longitudinali ha permesso di caratterizzare con migliore precisione le fasi prodromiche delle demenze e di

fornire al clinico elementi di supporto per formulare una diagnosi preclinica, quando la demenza non è ancora conclamata (Padovani, 2005).

Nonostante la sua importanza clinica, la corretta identificazione del MCI rimane un difficile problema da risolvere. Al fine di effettuare una corretta diagnosi dei soggetti con MCI i clinici si avvalgono dell'uso combinato di test neuropsicologici, di tecniche di neuroimmagine e della valutazione dei marcatori biochimici, liquorali e plasmatici.

Benché tali metodologie mostrano un'elevata specificità e sensibilità nella diagnosi delle demenze, non si può affermare lo stesso circa la valutazione del MCI, patologia nella quale la ricerca ha ottenuto risultati solo parziali (Padovani, 2005).

Come per l'AD, il trattamento farmacologico del MCI prevede l'utilizzo di AChEI. Ci sono anche evidenze che mostrano un legame tra nutrizione e protezione contro il declino cognitivo. Per esempio, studi che esaminano nutrienti come il consumo di grassi nella dieta, hanno trovato che un basso consumo di grassi e colesterolo è associato con un minor declino cognitivo durante l'invecchiamento. Antiossidanti come la vitamina E e la vitamina C sono associati con vari effetti benefici come una minore incidenza di sviluppare, in età avanzata, malattie cardiovascolari (Petersen e Negasi, 2008), uno tra i principali fattori di rischio per l'insorgenza del decadimento cognitivo e nella successiva progressione ad AD.

2.6.1 Valutazione dei marcatori biologici.

Accanto ai progressi e allo sviluppo delle tecniche di neuroimmagine, nell'ultimo decennio sono enormemente aumentati gli studi per l'individuazione di marker biologici che possono essere utili per differenziare soggetti con MCI da individui sani (Kelly and Peterson, 2009).

L'analisi dei biomarcatori nel MCI, come per l'AD, include la valutazione, al livello del fluido cerebrospinale (CSF), delle concentrazioni di $A\beta_{1-42}$ e della proteina tau (τ). L'analisi di questi marker associati alle immagini *in vivo*, attraverso la tomografia ad emissione di positroni (PET), dell'accumulo della proteina amiloide, rappresentano probabilmente le tecniche più utili nella diagnosi di MCI (Satler Diniz et al, 2008).

E' stato riscontrato che le concentrazioni di $A\beta_{1-42}$ a livello del CSF sono ridotte del 50% circa nei pazienti con MCI se comparato con soggetti di controllo; questo decremento è stato associato con una accresciuta deposizione di $A\beta_{1-42}$ a livello dell'encefalo. Al contrario, i livelli totali della proteina tau (T- τ) sono incrementati in media da due a tre volte nel MCI (come nell'AD), mentre alcuni sottotipi di fosfo- τ (τ -P), ad esempio τ -P₂₃₁ o τ P₁₈₁, possono

essere incrementati da uno a due ordini di grandezza se comparati con i livelli di controllo. Ridotti livelli di CSF $A\beta_{1-42}$ e aumentati livelli di CSF τ rappresentano cambiamenti caratteristici sia per la fase prodromale dell'AD, che per la fase di demenza. Effettivamente, il rapporto $\tau/A\beta_{1-42}$ sembra utile per distinguere pazienti con decadimento cognitivo dai controlli (Sonnen et al., 2009).

Questi marker possono essere utili nel predire la progressione da MCI ad AD. Uno studio multinazionale ha evidenziato che i livelli basali di τ -P₂₃₁, ma non di T- τ , sono in correlazione con il declino cognitivo e nella conversione da MCI a demenza. Un altro recente studio (Hansson et al., 2006) che indaga l'utilità della concentrazione di $A\beta_{1-42}$, T- τ e τ -P₁₈₁, a livello del CSF, nel predire la progressione da MCI a demenza, riporta una sensibilità del 95% ed una specificità dell'83%, se si analizza la combinazione di elevati livelli di T- τ e bassi livelli di $A\beta_{1-42}$ (Kelly and Peterson, 2009).

Sfortunatamente, nessuno di questi cambiamenti nella concentrazione delle proteine del CSF è specifico per questi disordini neurodegenerativi (Sonnen et al., 2009). I dati fino ad ora disponibili, sono insufficienti nel raccomandare l'uso dei biomarker del CSF per la valutazione del MCI (Kelly and Peterson, 2009).

Alcuni gruppi di ricerca hanno anche analizzato i livelli di queste proteine nel plasma, mostrando che una diminuzione del rapporto $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ è associata con un aumentato rischio di sviluppare MCI o AD (Sonnen et al., 2009). Queste scoperte però non sono state confermate da altri studi, i quali concludono che i livelli plasmatici di $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$, e il loro rapporto non sembrano essere utili biomarker per la diagnosi di tali patologie (Sonnen et al., 2009).

2.6.2. Stress ossidativo nel decadimento cognitivo lieve.

Anche se sono stati condotti molti studi volti a consolidare l'influenza dello stress ossidativo nella patogenesi dell'AD, si conosce ancora poco sul suo ruolo nel MCI.

Diversi studi mostrano un aumento del danno ossidativo, calcolato come aumento dei livelli di 8-OHdG, sia a livello del DNA nucleare che del DNA mitocondriale, estratti rispettivamente dalla corteccia del lobo frontale e temporale (Lovell, 2007).

Dall'analisi del plasma dei pazienti affetti da MCI si evince una diminuzione dei livelli di antiossidanti non enzimatici e decremento dell'attività di antiossidanti enzimatici se questi vengono comparati con i livelli di antiossidanti di soggetti di controllo, mentre non sono

state riscontrate alterazioni nei livelli di proteine. Questa diminuzione degli antiossidanti potrebbe portare ad un aumento della produzione di radicali liberi durante il progredire della malattia (Butterfield et al., 2008). Inoltre sono stati riscontrati livelli più elevati di F₂-isoprostano nel plasma, nelle urine e nel CSF se confrontati con quelli di soggetti sani (Butterfield et al., 2008), suggerendo che la perossidazione lipidica potrebbe rappresentare un evento precoce nella patogenesi della malattia (Mariani et al, 2005).

Marker di perossidazione lipidica come HNE libero e legato a proteine, TBARS e MDA sono incrementati nel tessuto cerebrale di soggetti con MCI; elevati livelli di HNE legato a proteine sono stati riscontrati soprattutto a livello dell'ippocampo. Questi risultati suggeriscono l'accumulo di stress ossidativo nell'encefalo di pazienti MCI e sono in armonia con la nozione che lo stress ossidativo potrebbe essere un evento precoce nella progressione da MCI a AD (Butterfield et al., 2008).

3. Scopo della tesi.

Considerando il possibile coinvolgimento dello stress ossidativo nella patogenesi delle malattie neurologiche, lo scopo del presente lavoro di tesi è di valutare alcuni parametri di stress ossidativo in soggetti affetti da malattia di Alzheimer e da decadimento cognitivo lieve.

A tal fine, sono stati condotti dosaggi biochimici, su campioni di plasma, per analizzare i seguenti marker di stress ossidativo:

- i livelli plasmatici dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP), un marker che permette di identificare la quantità di proteine modificate da processi di ossidazione;
- la capacità ferro-riducente del plasma (FRAP), un parametro che consente di verificare il potere antiossidante del plasma;
- il glutatione totale (GSH) nel sangue intero.

4. Pazienti e metodi.

4.1 Soggetti in studio.

Nel presente studio, sono stati analizzati pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD) e da decadimento cognitivo lieve (MCI) e i relativi controlli tutti residenti nei Comuni della Lunigiana, nell'ambito di uno studio condotto presso il Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Pisa.

Il reclutamento, che prevede un campionamento con soggetti di età non inferiore ai 60 anni, è avvenuto previo consenso informato dopo aver spigato le modalità, le caratteristiche e le finalità dello studio.

Il campionamento è stato condotto con modalità differenti nelle due popolazioni AD e MCI: per i pazienti affetti da AD conclamata, il reclutamento è stato effettuato a campione su pazienti già diagnosticati o diagnosticati *de novo*, durante il periodo di studio e seguiti presso la U.O. di Neurologia della ASL 1 di Massa Carrara, come affetti da probabile AD. Per quanto riguarda i pazienti affetti da MCI, il reclutamento è avvenuto sia su pazienti che afferiscono presso la U.O. di Neurologia della ASL 1 di Massa Carrara che attraverso l'intervento dei medici di base, che hanno avuto il compito di informare i soggetti con tali caratteristiche cliniche sulla possibilità di essere inclusi in questo studio.

I gruppi presi in considerazione in questo lavoro di tesi sono omogenei per sesso ed età; in particolare sono stati analizzati 32 pazienti: 18 individui affetti da AD (età media \pm deviazione standard: 77.94 ± 5.16), di cui 14 femmine (età media \pm deviazione standard: 77.23 ± 4.96) e 4 maschi (età media \pm deviazione standard: 80.25 ± 5.85), 14 individui affetti da MCI (età media \pm deviazione standard: 81 ± 4.54) di cui 5 femmine (età media \pm deviazione standard: 80.4 ± 6.06) e 9 maschi (età media \pm deviazione standard: 81.33 ± 3.8), e 33 controlli sani (età media \pm deviazione standard: 73.33 ± 7.01) di cui 20 femmine (età media \pm deviazione standard: 72.2 ± 6.90) e 13 maschi (età media \pm deviazione standard: 75.07 ± 7.08). I due gruppi, pazienti e relativi controlli, differiscono per un'unica variabile, vale a dire, rispettivamente, presenza o assenza della patologia.

Ai soggetti in studio viene effettuato, a digiuno, un prelievo di sangue venoso al fine di valutare i livelli plasmatici di marcatori biologici quali i prodotti di ossidazione delle proteine (AOPP), la capacità ferro-riducente del plasma (FRAP) e il glutatione totale (GSH).

4.2 Dosaggi biochimici.

4.2.1 Determinazione dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP).

La determinazione degli AOPP è una metodica che permette di stimare la quantità di proteine che hanno subito un processo di ossidazione, a livello di specifici residui amminoacidici, da parte di specie chimiche reattive.

Tale dosaggio biochimico è eseguito seguendo il protocollo descritto da Witko-Sarsat et al. (1996).

1. Preparazione dei campioni: il sangue venoso dei pazienti e dei controlli, raccolto in provette K-EDTA, viene centrifugato, entro due ore dal prelievo, a 3.000 rpm, per 10 minuti, al fine di separare la parte corpuscolata dal plasma, il quale viene conservato a -20°C fino al momento del dosaggio biochimico, momento in cui i campioni vengono scongelati a 37°C.

2. Preparazione delle soluzioni:

- 500 ml di tampone fosfato di Dulbecco (PBS): si sciolgono 4.77 gr di PBS in polvere con 500 ml di acqua distillata mediante l'uso di un agitatore magnetico;
- standard di cloramina T 0.1 mM: da una soluzione 10 mM (100X) che si ottiene sciogliendo 2,276 gr di cloramina T per litro di PBS, si procede con delle diluizioni a seriali di cloramina T 1 mM (10X), ottenuta prelevando 100 µl di stock ai quali vengono aggiunti 900 µl di PBS, e cloramina T 0.1 mM (1X) che si ottiene aggiungendo a 140 µl di soluzione 10X, 1.200 µl di PBS. Da qui si fanno le varie diluizioni scalari per ogni standard, utilizzando 700 µl di PBS a cui si aggiungono 700 µl della soluzione precedente, seguendo lo schema sottostante:
 - 1:2 (0,05 mM): 700 µl di standard 1X più 700 µl di PBS;
 - 1:4 (0,025 mM): 700 µl dello standard 1:2 più 700 µl di PBS;
 - 1:8 (0,0125 mM): 700 µl dello standard 1:4 più 700 µl di PBS;
 - 1:16 (0,00625 mM): 700 µl dello standard 1:8 più 700 µl di PBS;
 - 1:32 (0,003125 mM): 700 µl dello standard 1:16 più 700 µl di PBS;
 - 1:64 (0,0015625 mM): 700 µl dello standard 1:32 più 700 µl di PBS;
 - bianco (0 mM): 700 µl di PBS.
- Ioduro di potassio (KI) 1,16 M: sciogliere 1,9256 gr di polvere in 10 ml di acqua distillata.

3. Determinazione degli AOPP: è eseguita su piastre da 96 pozzetti, trasparenti agli UV (Greiner bio-one); in ogni pozzetto si caricano, in doppio, dopo averli vortexati, prima il bianco e gli standard, poi i campioni di plasma. In particolare, il bianco sarà costituito solo da 200 μ l di PBS, gli standard saranno costituiti da 200 μ l delle soluzioni a varie concentrazioni alle quali si aggiungono 20 μ l di CH_3COOH e 10 μ l di KI. Riguardo ai campioni, si caricano 30 μ l di plasma ai quali si aggiungono 170 μ l di PBS, 20 μ l di CH_3COOH e 10 μ l di KI. Segue un'incubazione della miscela di reazione, a temperatura ambiente, di un minuto, al termine della quale si procede con la determinazione del valore di assorbanza ad una lunghezza d'onda di 340 nm, mediante l'ausilio di un lettore di piastre (VICTOR3, Perkin Elmer). Il valore di assorbanza del campione deve essere compreso tra il valore di assorbanza del bianco e il valore di assorbanza dello standard 1:2, se supera, o è minore di, tale intervallo, non può essere considerato accettabile.

Si procede allestendo una curva di calibrazione utilizzando le diluizioni scalari della soluzione di cloramina T 0.1 mM. La media dei valori di assorbanza dei campioni viene sottratta alla media dei valori di assorbanza del bianco; i valori degli AOPP verranno espressi in nmol/ml di equivalenti di cloramina T.

4.2.2 Determinazione della capacità ferro-riducente del plasma (FRAP).

La determinazione della FRAP è una metodica che consente di valutare la capacità antiossidante del plasma mediante la riduzione, da parte del plasma stesso, dello ione ferrico, presente nel reattivo FRAP, in ione ferroso.

Tale dosaggio biochimico viene eseguito secondo il protocollo descritto da Benzie e Stran (1996).

1. Preparazione dei campioni: il sangue venoso dei soggetti in studio, raccolto in provette litio-eparina, viene centrifugato, entro due ore dal prelievo, a 3.000 *rpm* per 10 minuti per ottenere il plasma, il quale viene conservato a -20°C e scongelato a 37°C al momento delle analisi.

2. Preparazione delle soluzioni:

- tampone sodio-acetato 300 mM, pH 3,6: si prepara miscelando l'acetato di sodio (CH_3COONa) 300 mM con l'acido acetico (CH_3COOH) 300 mM; in particolare si sciolgono 0,817 gr di CH_3COONa in 20 ml di acqua distillata mediante l'uso di un agitatore, e si diluiscono 1,716 ml di CH_3COOH in 100 ml di acqua distillata. Si procede con il pHare la soluzione di CH_3COOH : dopo aver lavato e tarato l'elettrodo

- del pHmetro, si immerge nella suddetta soluzione e, dopo aver atteso lo stabilizzarsi della lettura, si aggiunge la soluzione di CH_3COONa fino a raggiungere un pH di 3,6.
- Acido cloridrico (HCl) 0,04 M e 0,01 M: si parte da uno stock che ha concentrazione 12 M, da questo si fanno delle diluizioni scalari:
 - HCl (1 M): ad 1 ml di stock 12 M si aggiungono 11 ml di acqua distillata;
 - HCl (0,04 M): ad 1 ml di HCl 1 M si aggiungono 24 ml di acqua distillata;
 - HCl (0,01 M): a 5 ml di HCl 0,04 M si aggiungono 15 ml di acqua distillata.
 - Solfato di ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 4 mM disciolto in HCl 0,01M (stock): si prepara sciogliendo 11,1 mg di $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 10 ml di HCl; seguono diluizioni scalari in HCl (0,01 M) a partire dallo stock 4 mM, seguendo lo schema sottostante:
 - 2 mM: 100 μl di stock in 100 μl di HCl;
 - 1 mM: 100 μl di 2mM in 100 μl di HCl;
 - 0,5 mM: 100 μl di 1 mM in 100 μl di HCl;
 - 0,25 mM: 100 μl di 0,5 mM in 100 μl di HCl;
 - 0,125 mM: 100 μl di 0,25 mM in 100 μl di HCl;
 - 0,00625 mM: 100 μl di 0,0125 mM in 100 μl di HCl;
 - bianco (0 mM): solo 100 μl di HCl.
 - Tripiridiltriazina 10mM disciolta in HCl 40 mM: si sciolgono 15,62 mg di tripiridiltriazina in 5 ml di HCl.
 - Cloruro ferrico (FeCl_3) 20 mM, disciolto in H_2O : si sciolgono 27 mg di FeCl_3 in 5 ml di acqua distillata.

Dopo aver preparato tutte le soluzioni, si procede con la preparazione del reattivo FRAP che si ottiene miscelando 10 volumi di tampone sodio-acetato 300 mM, pH 3,6, 1 volume di tripiridiltriazina 10 mM in HCl 40 mM e 1 volume di FeCl_3 20 mM, disciolto in acqua. Il reattivo ottenuto, viene incubato per 10 minuti a 37°C.

3. Determinazione della FRAP: viene eseguita su una piastra da 96 pozzetti (SARSTEDT); nei pozzetti si caricano, in doppio, 8 μl di bianco/standard/plasma di ciascun campione, ai quali si aggiungono 250 μl di reattivo FRAP.

L'assorbanza della miscela di reazione sarà valutata alla lunghezza d'onda di 620 nm mediante l'ausilio di un lettore di piastre ELISA (Tecan SPRECTRA). Il valore di assorbanza del campione deve essere compreso tra il valore minimo e il valore massimo della curva standard. Si procede costruendo una curva di calibrazione utilizzando i valori di assorbanza delle diluizioni scalari di $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. La media dei valori di assorbanza dei

campioni viene sottratta al valore di assorbanza del bianco; i valori della FRAP saranno espressi in mmol/l.

4.2.3 Determinazione del glutatione totale (GSH).

Il glutatione (GSH) è una molecola, presente in gran quantità nella maggior parte delle cellule, che possiede un gruppo tiolico libero; tale caratteristica le conferisce un ruolo protettivo contro lo stress ossidativo, essendo tra i più potenti degli antiossidanti endogeni presenti nell'organismo.

Il contenuto del glutatione totale su sangue intero venoso è stato determinato con il metodo della cinetica enzimatica descritto da Tietze (1969) e modificato da Baker et al. (1990).

1. Preparazione dei campioni: entro due ore dal prelievo, si aggiungono a 990 µl di acido sulfosalicilico (SSA) 1%, 10 µl di sangue venoso, raccolto in provette Na²⁺-EDTA. Il campione viene incubato per 30 minuti a 4°C, per poi essere centrifugato a 12.000 g, a 4°C, per 5 minuti. In tal modo si ottiene l'estratto acido che viene conservato a -20°C fino al momento del dosaggio. Al momento della determinazione, i campioni vengono scongelati a temperatura ambiente.

2. Preparazione delle soluzioni:

- SSA 1%: si sciolgono 10 gr di polvere in 100 ml acqua distillata mediante l'uso di un agitatore;
- Standard di glutatione ossidato o glutatione disulfide (GSSG) in tampone sodio-fosfato (tampone NaPO₄): si parte da uno stock di GSSG 1.000X formato da 2 mg di GSSG sciolti in 1 ml di tampone NaPO₄. Seguono le diluizioni in SSA 1%:
 - GSSG (100X): a 900 µl di SSA si aggiungono 100 µl di GSSG 1.000X,
 - GSSG (10X): a 900 µl di SSA vengono aggiunti 100 µl di GSSG 100X.Dal GSSG 10X si fanno le diluizioni scalari secondo lo schema sottostante:
 - 1:2 (0,05 mM): 100 µl di GSSG 10X aggiunti a 100 µl di SSA 1%,
 - 1:4 (0,025 mM): 100 µl di GSSG 1:2 aggiunti a 100 µl di SSA 1%,
 - 1:8 (0,0125 mM): 100 µl di GSSG 1:4 aggiunti a 100 µl di SSA 1%,
 - 1:16 (0,00625 mM): 100 µl di GSSG 1:8 aggiunti a 100 µl di SSA 1%,
 - 1:32 (0,003125 mM): 100 µl di GSSG 1:16 aggiunti a 100 µl di SSA 1%,
 - 1:64 (0,0015625 mM): 100 µl di GSSG 1:32 aggiunti a 100 µl di SSA 1%,
 - bianco (0 mM): 200 µl di SSA 1%.

- Tampone NaPO_4 0,1 M e pH 7,5 contenente EDTA 1 mM: viene preparato a partire da due soluzioni:
 - a) soluzione di Na_2HPO_4 (0,1 M) con EDTA (1 mM), per 400 ml: pesare 5.6784 gr di Na_2HPO_4 , sciogliere in circa 300 ml di acqua, aggiungere 0,8 ml di EDTA (0,5 M), portare a volume con acqua.
 - b) soluzione di NaH_2PO_4 (0,1 M) con EDTA (1 mM), per 200 ml: pesare 2,4 gr di NaH_2PO_4 , sciogliere in circa 100 ml di acqua, aggiungere 0,4 ml di EDTA (0,5 M), portare a volume con acqua.

Si procede con il pHare la soluzione “a”: in particolare, dopo aver lavato e tarato l’elettrodo del pHmetro, si immerge nella suddetta soluzione e, dopo aver atteso lo stabilizzarsi della lettura, si aggiunge la soluzione “b” fino a raggiungere un pH di 7,5.

- β -nicotinamide-adenina-dinucleotide-fosfato (NADPH) 1 mM in tampone NaPO_4 : sciogliere 0,833 mg di NADPH, a temperatura ambiente, in 1 ml di tampone, una volta preparata, mantenere la soluzione in ghiaccio,
- 5-5’-di-tio-bis(2nitrobenzoico), (DTNB) 1 mM in tampone NaPO_4 : sciogliere 0,396 mg di DNTP in 1 ml di tampone, una volta preparata, la soluzione v  conservata al buio e a temperatura ambiente.
- GSH reduttasi.

Si prepara una miscela di reazione; per 96 pozzetti, si preparano 12,4 ml di miscela costituita da:

- 2,8 ml di DTNB,
- 3,75 ml di NADPH,
- 5,85 ml di tampone NaPO_4 ,
- 20 U di GSH redattasi.

3. Determinazione del GSH: viene eseguita su una piastra da 96 pozzetti; in ogni pozzetto, si caricano in doppio, 5 μl di standard/campione, 45 μl di tampone NaPO_4 , 100 μl di miscela. Dopo aver agitato la piastra, si misura il valore di assorbanza dei campioni: si effettua una lettura in cinetica, ovvero una lettura ogni 10 secondi, per 3 minuti, ad una lunghezza d’onda di 405 nm. Ai valori di variazione di assorbanza al minuto si sottraggono quelli relativi al bianco (SSA1%). La curva di calibrazione   stata allestita utilizzando le diluizioni scalari di GSSG 2 mg/ml; i valori del GSH vengono normalizzati per il valore dell’ematocrito, al fine di calcolare la concentrazione del GSH su numero di cellule, ed espressi in nmoli/ μl .

4.3 Analisi statistica.

Per ciascun parametro biochimico, AOPP, FRAP e GSH, è stato calcolato il valore medio e la deviazione standard (media \pm DS). Il confronto dei livelli dei tre parametri tra i gruppi presi in considerazione, pazienti affetti da AD, pazienti affetti da MCI e relativi controlli, è stato eseguito per mezzo del *test t di Student*. Sono stati messi a confronto pazienti affetti da AD e relativi controlli, pazienti MCI e relativi controlli, pazienti AD *versus* pazienti MCI, prima e dopo stratificazione per sesso. In tutti i casi considerati, la significatività statistica è stata considerata significativa per $p \leq 0,05$.

5. Risultati.

5.1 Prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP).

Dall'analisi dei livelli plasmatici degli AOPP si riscontra che il valore medio di tale marker di stress ossidativo è maggiore nei pazienti, MCI o AD, rispetto ai controlli; in particolar modo, si riscontra che nei soggetti affetti da MCI il valore medio degli AOPP è pari a 288.24 ± 17.98 nm/ml, un valore superiore rispetto a quello riscontrato nei controlli (194.89 ± 9.38 nm/ml) e questa differenza è statisticamente significativa ($p < 0.0001$); nei soggetti affetti da AD il valore medio del marker in esame è pari a 227.92 ± 13.37 nm/ml rispetto a 194.89 ± 9.38 nm/ml dei controlli; anche in questo caso, tale differenza risulta statisticamente significativa ($p < 0.0001$), come mostrato nel grafico seguente.

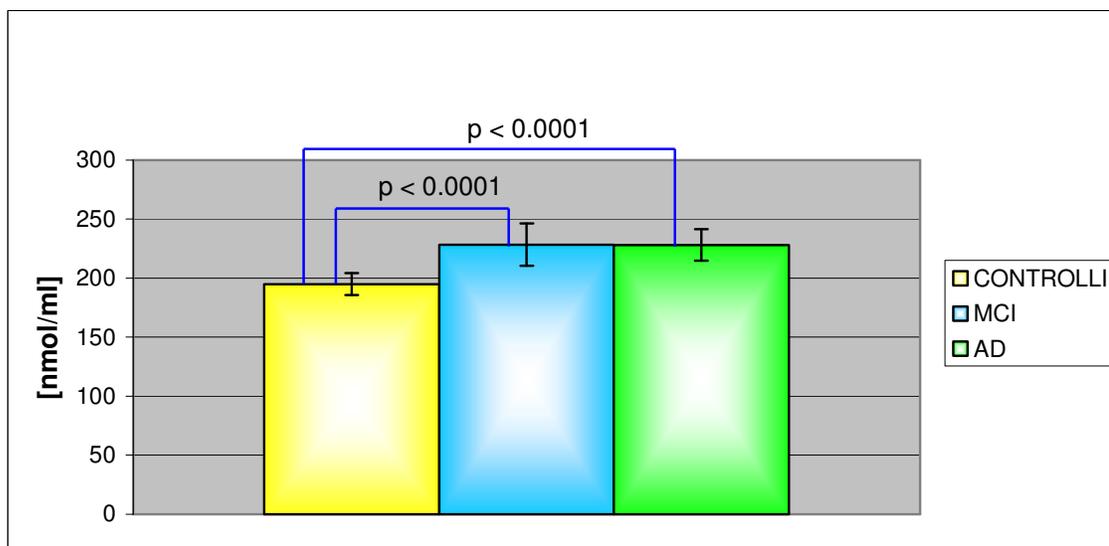


Grafico 1. Confronto dei valori plasmatici degli AOPP dei controlli vs i pazienti con MCI e dei controlli vs i pazienti con AD.

La significatività si riscontra anche dopo stratificazione per sesso: il valore medio degli AOPP è incrementato sia se si analizza il gruppo di MCI di sesso femminile rispetto ai relativi controlli (233.77 ± 22.89 nm/ml vs 197.74 ± 8.448 nm/ml; $p < 0.0001$), sia se si considera il gruppo di MCI di sesso maschile rispetto ai relativi controlli (225.18 ± 15.287 nm/ml vs 195.12 ± 11.029 nm/ml; $p < 0.0001$), come si può notare dal grafico sottostante.

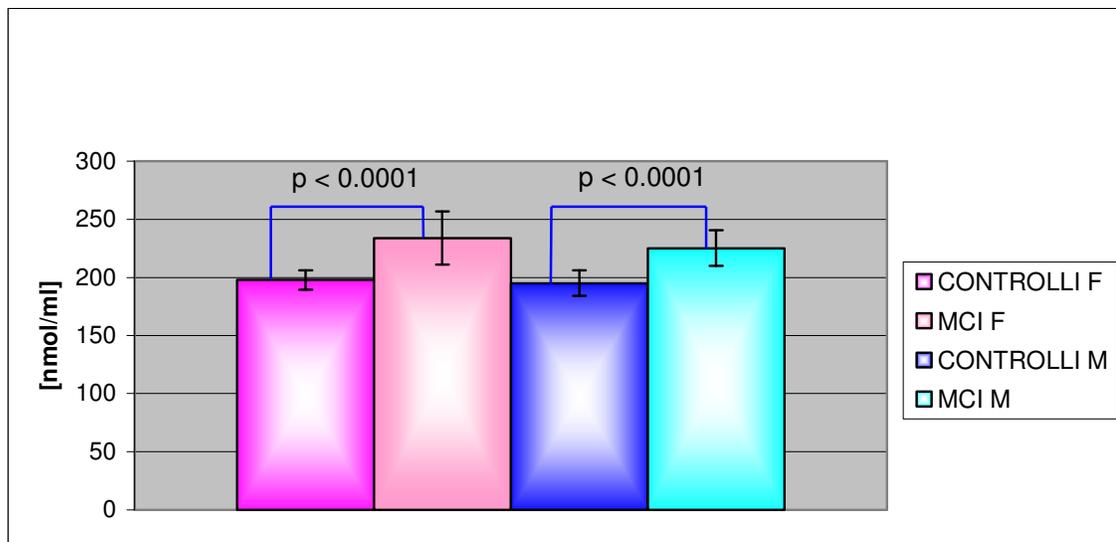


Grafico 2. Confronto dei livelli plasmatici degli AOPP tra pazienti MCI di sesso femminile e relativi controlli e tra controlli MCI di sesso maschile e relativi controlli.

Un incremento dei valori di tale marker di stress ossidativo si riscontra anche nel confronto tra il gruppo AD di sesso femminile rispetto ai relativi controlli (229.13 ± 11.52 nm/ml vs 197.74 ± 8.448 nm/ml; $p < 0.0001$) e nel confronto del gruppo di AD di sesso maschile rispetto ai relativi controlli (223.68 ± 20.178 nm/ml vs 195.12 ± 11.029 nm/ml; $p < 0.05$), come mostrato nel grafico 3.

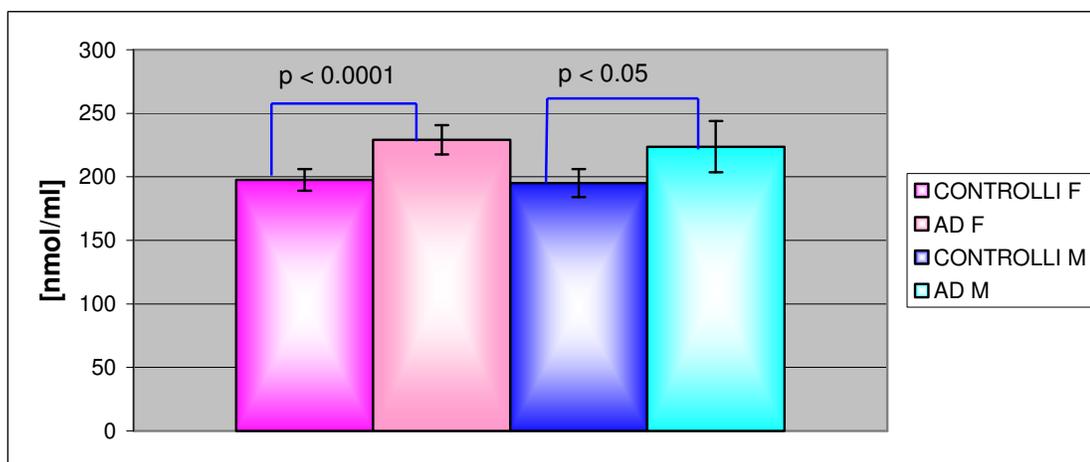


Grafico 3. Confronto dei livelli plasmatici degli AOPP tra pazienti AD di sesso femminile e relativi controlli e tra pazienti AD di sesso maschile e relativi controlli.

L'analisi dei valori degli AOPP effettuata sul confronto tra i pazienti affetti da MCI rispetto ai pazienti affetti da AD non evidenzia nessuna differenza apprezzabile, sia quando i due gruppi vengono analizzati nella totalità (228.24 ± 17.98 nm/ml vs 227.92 ± 13.37 nm/ml; $p = 0.95$), sia quando vengono separati in base al sesso: (F: 233.77 ± 22.89 nm/ml vs 229.13 ± 11.52 nm/ml; $p = 0.56$; M: 225.18 ± 15.287 nm/ml vs 223.68 ± 20.178 nm/ml; $p = 0.88$), come mostrato nel grafico seguente.

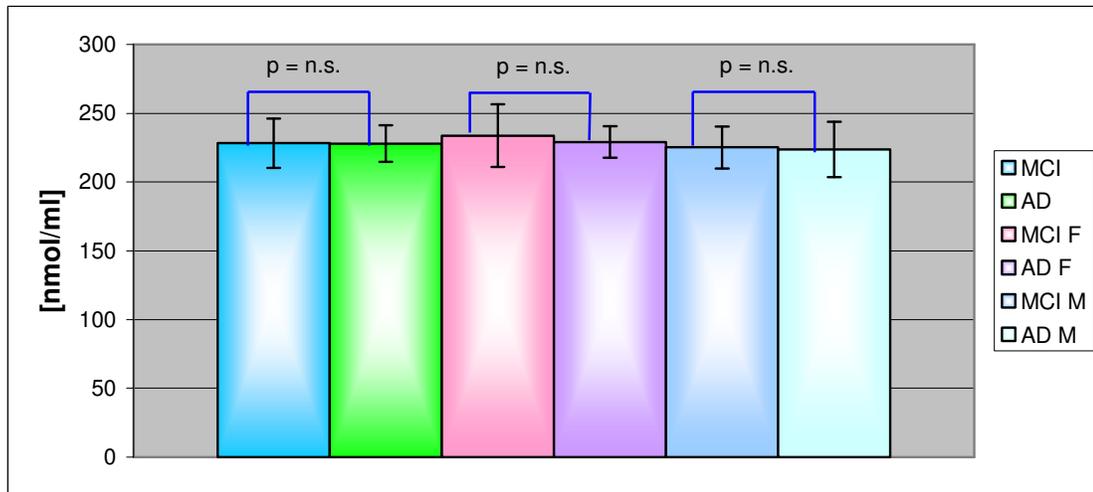


Grafico 4. Confronto dei valori plasmatici degli AOPP dei due gruppi di pazienti prima e dopo stratificazione per sesso.

5.2 Capacità ferro riducente del plasma (FRAP).

Dall'analisi della FRAP, emerge che i livelli di tale marker di stress ossidativo diminuiscono nei pazienti se confrontati con i relativi controlli e tale differenza è statisticamente significativa.

In modo particolare, si può notare una diminuzione dei livelli della FRAP sia nei pazienti affetti da MCI rispetto ai relativi controlli (0.611 ± 0.037 nmol/L vs 0.831 ± 0.058 nmol/L; $p < 0.0001$), che nei pazienti affetti da AD rispetto ai relativi controlli (0.574 ± 0.03 nmol/L vs 0.831 ± 0.058 nmol/L; $p < 0.0001$), come mostrato nel grafico sottostante.

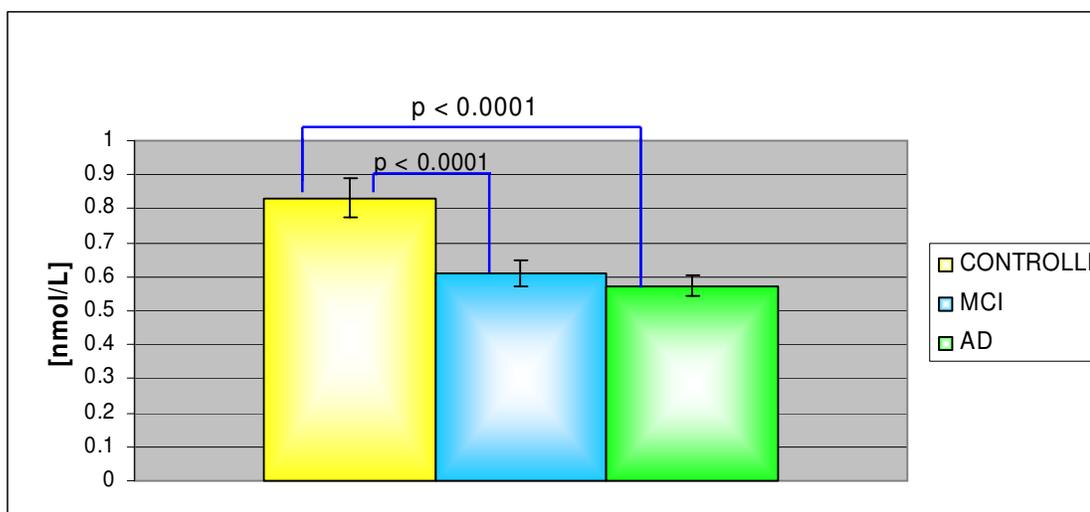


Grafico 5. Confronto dei valori plasmatici della FRAP tra controlli, soggetti affetti da MCI e da AD.

Anche dopo separazione dei due gruppi di pazienti in base al sesso si nota una diminuzione dei livelli della FRAP ed in particolar modo, nei pazienti affetti da MCI di sesso femminile tale valore è pari a 0.602 ± 0.026 nmol/L rispetto ai relativi controlli nei quali è pari a 0.828 ± 0.058 nmol/L, questa differenza è statisticamente significativa ($p < 0.0001$); nei pazienti MCI di sesso maschile è pari a 0.616 ± 0.043 nmol/L contro un valore di 0.821 ± 0.058 nmol/L dei relativi controlli e tale differenza è statisticamente significativa ($p < 0.0001$), come mostrato nel grafico 6. Tale significatività si riscontra anche se si analizzano i pazienti di sesso femminile affetti da AD rispetto ai relativi controlli (0.581 ± 0.028 nmol/L vs 0.828 ± 0.058 nmol/L; $p < 0.0001$) e i pazienti AD di sesso maschile rispetto ai relativi controlli (0.551 ± 0.053 nmol/L vs 0.821 ± 0.058 nmol/L; $p < 0.0001$), come mostrato nel grafico 7.

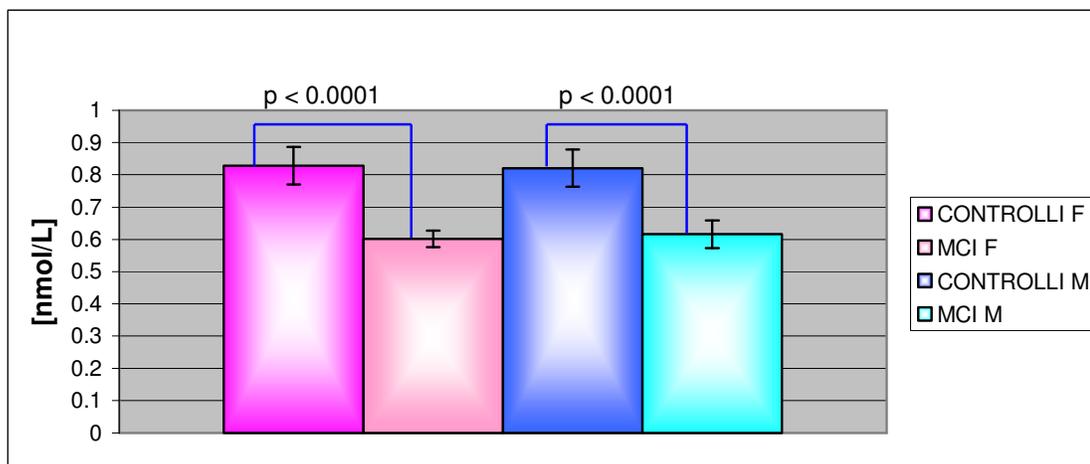


Grafico 6. Confronto dei livelli plasmatici della FRAP tra controlli e pazienti MCI dopo suddivisione in base al sesso.

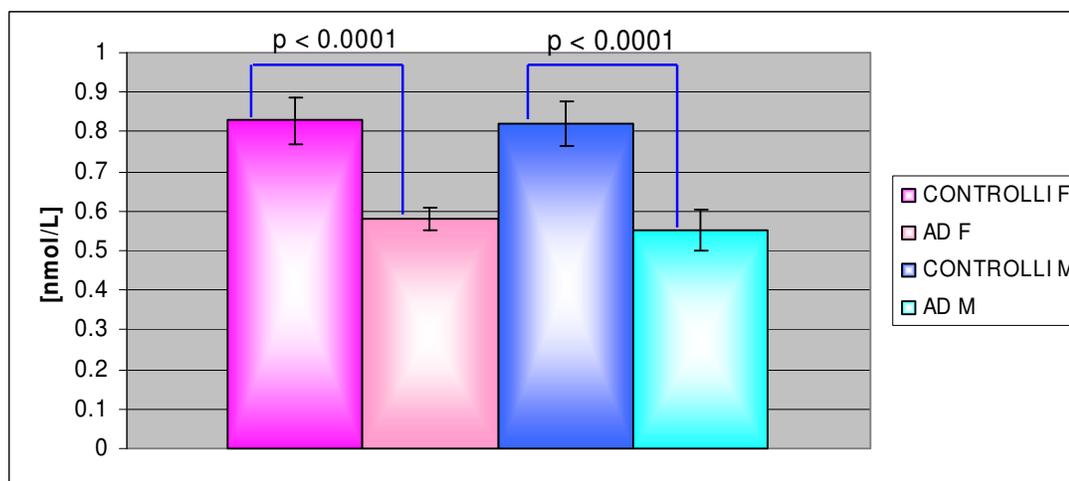


Grafico 7. Confronto dei livelli della FRAP tra controlli e pazienti AD dopo suddivisione in base al sesso.

Come si può notare dal grafico 8, confrontando i due gruppi di pazienti emerge che vi è una differenza statisticamente significativa (0.611 ± 0.037 nmol/L vs 0.574 ± 0.03 nmol/L; $p < 0.05$); tale differenza si mantiene, dopo stratificazione per sesso, solo se si prende in considerazione il gruppo di pazienti di sesso maschile (MCI vs AD: 0.616 ± 0.037 nmol/L vs 0.551 ± 0.053 nmol/L; $p < 0.05$); invece se si confrontano i pazienti di sesso femminile la differenza non è statisticamente significativa (0.602 ± 0.026 nmol/L vs 0.581 ± 0.028 nmol/L; $p = 0.16$).

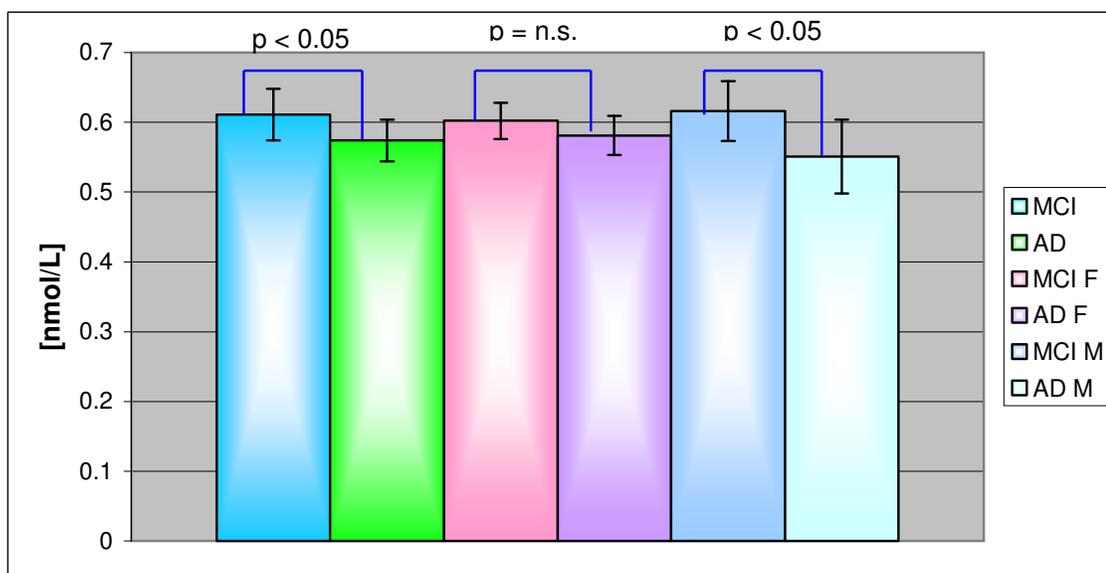


Grafico 8. Confronto dei livelli plasmatici della FRAP nei pazienti affetti da MCI vs i pazienti affetti da AD prima e dopo stratificazione in base al sesso.

5.3 Glutazione totale.

L'analisi dei livelli di glutazione totale su sangue intero mette in evidenza che vi è un decremento, di tale molecola, nei pazienti rispetto ai controlli e tale differenza è statisticamente significativa. Considerando il gruppo dei pazienti separati in base al tipo di malattia da cui sono affetti, si nota che i livelli di glutazione totale diminuiscono rispetto agli individui sani sia confrontando i pazienti affetti da MCI rispetto ai controlli (0.973 ± 0.13 nmol/ μ l vs 1.296 ± 0.119 nmol/ μ l; $p < 0.0001$), sia confrontando i pazienti affetti da AD rispetto ai controlli (0.971 ± 0.08 nmol/ μ l vs 1.296 ± 0.119 nmol/ μ l; $p < 0.0001$), come mostrato nel grafico 9.

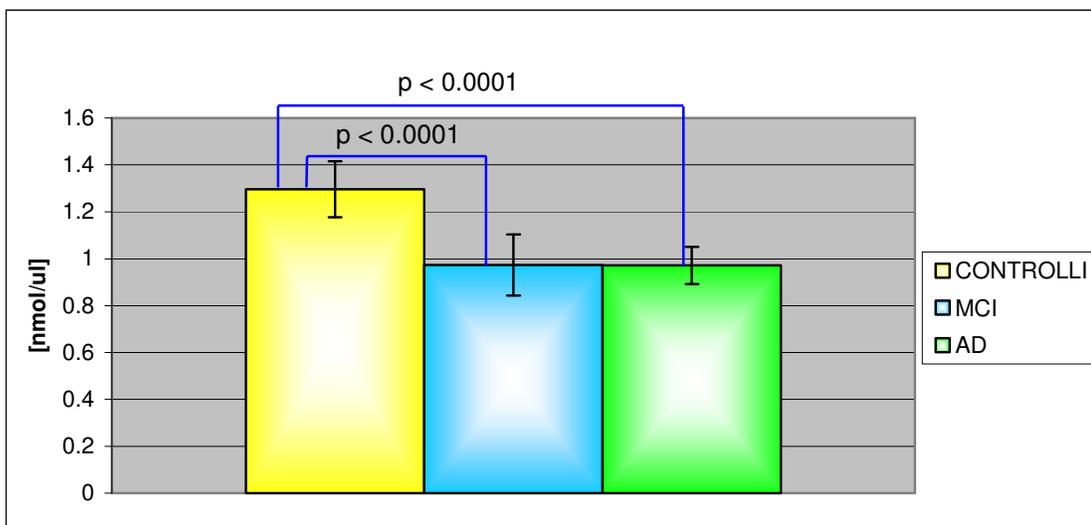


Grafico 9. Confronto dei livelli di glutazione totale tra il gruppo dei controlli, il gruppo dei pazienti affetti da MCI e dei pazienti affetti da AD.

Tale differenza rimane statisticamente significativa anche dopo stratificazione per sesso: i livelli di glutazione risultano ridotti sia nei pazienti MCI di sesso femminile rispetto ai relativi controlli (0.952 ± 0.156 nmol/ μ l vs 1.329 ± 0.067 nmol/ μ l; $p < 0.0001$) che nei pazienti MCI di sesso maschile rispetto ai relativi controlli (0.982 ± 0.136 nmol/ μ l vs 1.23 ± 0.181 nmol/ μ l; $p < 0.05$), come mostrato nel grafico seguente:

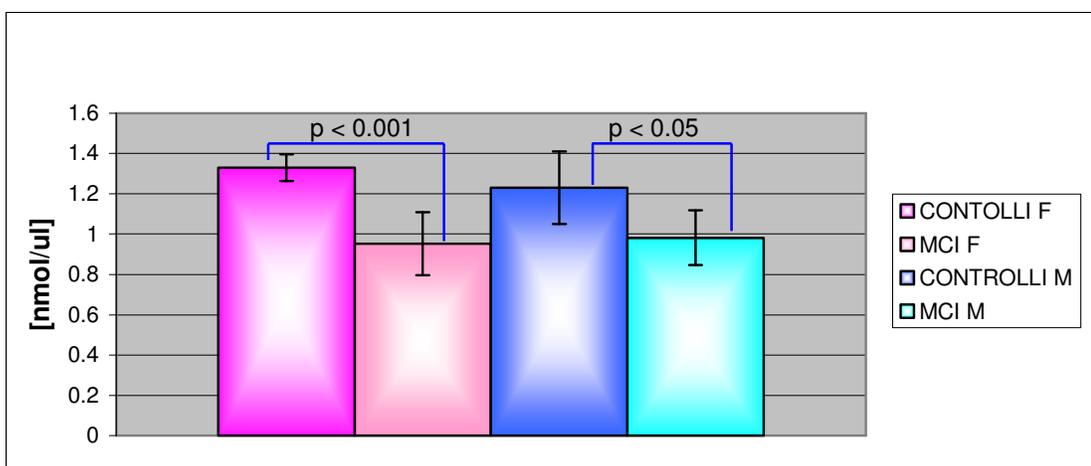


Grafico 10. Confronto dei livelli di glutazione totale tra controlli e pazienti MCI dopo stratificazione per sesso.

Una riduzione dei livelli di tale marker si osserva anche confrontando pazienti AD di sesso femminile rispetto ai relativi controlli (1.03 ± 0.094 nmol/ μ l vs 1.329 ± 0.067 nmol/ μ l), tale differenza è statisticamente significativa ($p < 0.0001$); differenza significativa che si riscontra anche emerge confronto tra pazienti AD di sesso maschile e i relativi controlli (0.921 ± 0.016 nmol/ μ l vs 1.23 ± 0.181 nmol/ μ l; $p < 0.05$), come si può notare dal grafico sottostante.

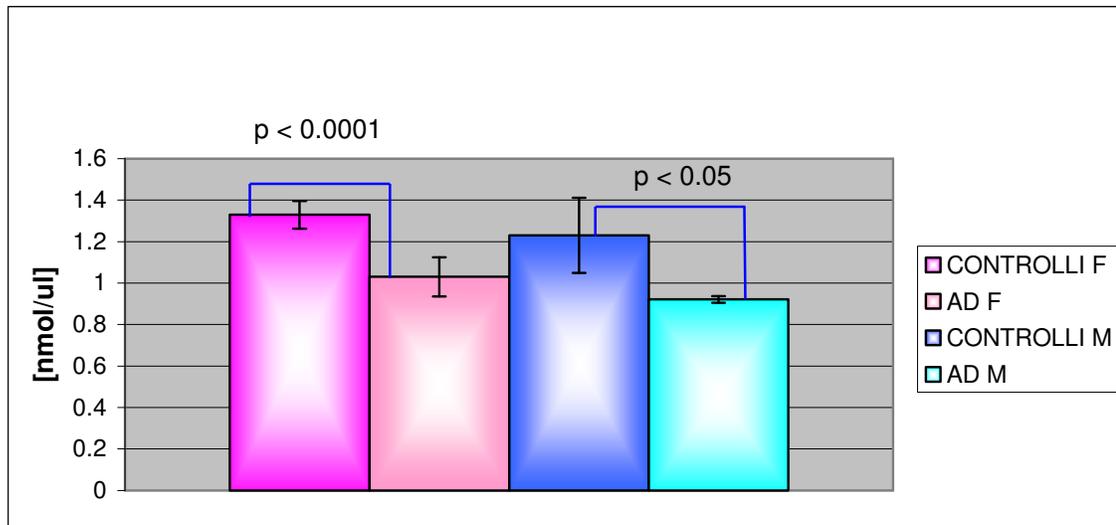


Grafico 11. Confronto dei livelli di glutazione totale tra controlli e pazienti AD dopo stratificazione per sesso.

Come mostrato nel grafico 12, il confronto tra i valori di glutazione totale tra i pazienti affetti da MCI e i pazienti affetti da AD non evidenzia alcuna differenza statisticamente apprezzabile, sia quando i due gruppi vengono analizzati nella totalità (0.973 ± 0.13 nmol/ μ l vs 0.971 ± 0.08 nmol/ μ l; $p = 0.95$), sia quando vengono separati in base al sesso (F: 0.952 ± 0.156 nmol/ μ l vs 1.03 ± 0.094 nmol/ μ l; $p = 0.63$; M: 0.982 ± 0.136 nmol/ μ l vs 0.921 ± 0.08 nmol/ μ l; $p = 0.46$).

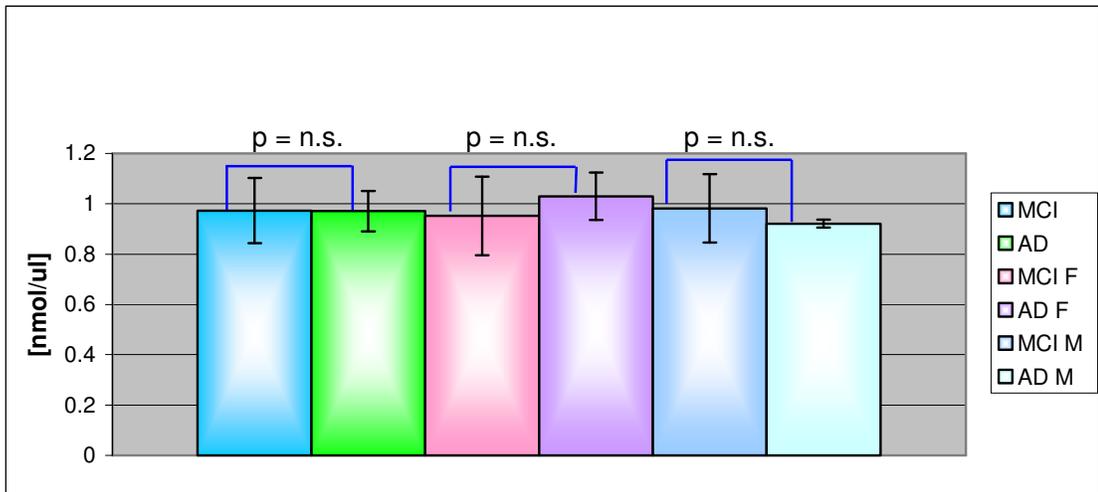


Grafico 12. Confronto dei livelli di glutazione totale tra il gruppo dei pazienti MCI e AD, prima e dopo stratificazione in base al sesso.

6. Discussione.

Lo stress ossidativo è considerato uno dei meccanismi responsabili del danno cellulare e neuronale riscontrato sia durante il normale processo di invecchiamento sia nello sviluppo delle malattie neurodegenerative (Good et al., 1996). Il ruolo dello stress ossidativo continua ad essere, per tale motivo, oggetto di estensive ricerche nello studio della malattia di Alzheimer (AD). Nel tessuto cerebrale di soggetti sani si riscontra una certa concentrazione di prodotti di ossidazione; tale concentrazione aumenta con l'età e risulta essere sostanzialmente più elevata nei soggetti affetti da AD rispetto ai soggetti sani della stessa età, già in stadi precoci della malattia (Longo e Massa, 2004). Diversi dati in letteratura riportano, come causa dei processi degenerativi, un aumento dei livelli delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), come l'anione superossido ($\cdot\text{O}_2^-$) e il radicale idrossile ($\cdot\text{OH}$), ed un incremento del perossido di idrogeno (H_2O_2), così come una diminuzione della funzionalità del sistema di difesa antiossidante (Longo e Massa, 2004).

Al fine di indagare se il danno ossidativo danneggia gli organismi viventi e la loro abilità a proteggersi contro tale danno, si possono eseguire diversi tipi di saggi (Abilés et al., 2006), che variano a seconda della componente biologica in studio. È ormai noto da tempo che un aumento delle specie chimiche reattive, provoca danni a livello delle macromolecole biologiche: acidi nucleici (DNA ed RNA), lipidi e proteine.

L'aumento dei livelli dell'8-OHdG, la forma predominante di addotto ad DNA, che si forma in seguito ai processi di ossidazione, viene spesso utilizzato come marker di danno ossidativo al DNA. In genere, il danno viene riparato attraverso il meccanismo di riparazione per escissione della base (BER) (Coppedè et al., 2009); si può quindi supporre che una diminuita abilità nel sistema di riparazione, induca l'accumulo di danno ossidativo a livello del DNA mitocondriale (mt-DNA) e del DNA nucleare (n-DNA) (Du et al., 2009). Una volta indotto, il danno può svolgere un ruolo critico nell'invecchiamento e nei disordini neurodegenerativi. In effetti, molteplici studi riportano una correlazione tra incremento del danno, difetti nel sistema di riparazione del DNA, invecchiamento e malattie neurodegenerative (Du et al., 2009). È stato dimostrato che l'ossidazione del DNA aumenta con l'età, mostrando un incremento a livello della corteccia cerebrale e del cervelletto di soggetti in età senile (Butterfield et al., 2008). In modo simile, nei pazienti affetti da AD, sia il mt-DNA che il n-DNA sono soggetti ad un aumento dell'8-OHdG a livello dei lobi temporali, parietali e frontali. Inoltre, il mt-DNA risulta essere più soggetto al danno ossidativo, approssimativamente di 10 volte, rispetto al n-DNA (Butterfield et al., 2008). Questi risultati

dimostrano che, nell'AD, il n-DNA e il mt-DNA sono sottoposti ad un estensivo danno ossidativo, il quale può contribuire allo sviluppo della patologia neurodegenerativa di questo disordine (Butterfield et al., 2008).

Nei soggetti AD non solo il DNA, ma anche l'RNA risulta ossidato; molti studi hanno dimostrato un aumento di ossidazione a livello dell'RNA messaggero (m-RNA) del 30-70%, a livello della corteccia frontale, rispetto al 2% dei soggetti di controllo. È stato mostrato anche un incremento nei livelli di ossidazione dell'RNA ribosomiale (r-RNA) a livello del lobo parietale inferiore dei soggetti AD rispetto agli individui di controllo. Aumentati livelli di 8-OHdG sono stati riportati anche a livello dell'ippocampo e della neocortex, di pazienti AD. Incrementi di tale marker di stress ossidativo, non sono stati riscontrati solo a livello del tessuto cerebrale, ma anche a livello del CSF prelevato da soggetti affetti da tale malattia. Queste osservazioni ci possono far supporre che l'ossidazione dell'RNA, potrebbe rendere le cellule incapaci di dar inizio al processo di sintesi proteica intralciando, in tal modo, i meccanismi di difesa cellulare che risultano essere fondamentali per evitare l'instaurarsi di un danno ossidativo (Butterfield et al., 2008).

Gli acidi grassi polinsaturi, presenti nelle lipoproteine e nei fosfolipidi di membrana, sono altamente suscettibili al danno da stress ossidativo; infatti è stato scoperto che quando le ROS raggiungono tali componenti cellulari, innescano una reazione a catena di auto-ossidazione, conosciuta con il nome di perossidazione lipidica. Per questo motivo, alcuni dei prodotti della perossidazione lipidica vengono utilizzati come biomarker, *in vivo*, nel monitoraggio del danno ossidativo. Per esempio, è stato riscontrato un aumento delle sostanze reattive per l'acido tiobarbiturico (TBARS) e dell'isoprostano, i prodotti finali della perossidazione, nel CSF e nel tessuto cerebrale di pazienti affetti da AD, anche i livelli del 4-idrossi-2-nonenale (HNE), un aldeide della perossidazione lipidica, sono risultati incrementati in pazienti affetti da tale malattia. (Sayre et al., 2005).

Il danno ossidativo a livello delle proteine, può essere una conseguenza diretta dell'ossidazione proteica da parte delle SCR, o una conseguenza indiretta, che si instaura a seguito dell'aggiunta dei prodotti secondari di ossidazione degli zuccheri (glicoossidazione) o dei lipidi (per ossidazione lipidica) (Sayre et al., 2005). È stato messo in evidenza che l'ossidazione delle proteine e dei lipidi conduce a perdita di funzione di diversi enzimi, tra cui quelli che regolano il trasporto del glutammato. Tale disregolazione può condurre ad eccitotossicità dovuta ad un eccessivo accumulo di glutammato a livello extracellulare e a perdita di funzione delle ATPasi, causando una disfunzione nell'omeostasi del calcio e un danneggiamento delle funzioni mitocondriali (Longo e Massa, 2004).

In uno studio condotto su modelli animali di AD, è stato riscontrato che le disfunzioni mitocondriali sembrano essere un evento precoce della malattia; il difetto più consistente, osservato a livello degli enzimi mitocondriali, riguarda l'attività del complesso IV della ETC, ovvero l'enzima citocromo c ossidasi (COX) (Fukui et al., 2007), responsabile della riduzione dell'ossigeno molecolare (Mancuso et al., 2009). In particolare, è stato riscontrato un decremento dell'attività della COX in diverse regioni cerebrali di pazienti affetti da AD (Butterfield et al., 2008; Mancuso et al., 2009). Inoltre è stata riscontrata una correlazione tra le anomalie mitocondriali e l'aumento dello stress ossidativo; molteplici studi mettono in evidenza che i difetti a livello della ETC inibiscono la produzione di ATP e incrementano la produzione di ROS (Butterfield et al., 2008; Mancuso et al., 2009).

In un recente studio (Liang et al., 2008) è stato analizzato il livello di espressione di alcuni geni che codificano per le subunità della ETC: comparando soggetti affetti da AD con soggetti sani, si nota che i livelli di espressione di tali geni sono sostanzialmente più bassi nei soggetti AD rispetto ai controlli e tale decremento si riscontra a livello della corteccia del cingolo posteriore, nel giro temporale mediale, nella regione CA1 dell'ippocampo, nella corteccia entorinale e in altre aree cerebrali (Mancuso et al., 2009).

Fattori quali l'accumulo di mutazioni a livello del mt-DNA, l'incremento dello stress ossidativo e il danneggiamento di alcuni enzimi della catena respiratoria mitocondriale (in particolar modo la COX), sono stati considerati come potenziali fattori che potrebbero essere implicati nell'insorgenza delle forme sporadiche di AD. Un recente studio, condotto da Fukui e collaboratori, ha riportato un'associazione tra la presenza di mutazioni puntiformi nel mt-DNA che codifica per le subunità della COX e i casi sporadici di AD, supportando l'ipotesi del contributo delle mutazioni del mt-DNA e della diminuita funzionalità della COX nello sviluppo dell'AD (Fukui et al., 2007).

Oltre a disfunzioni nell'attività della COX, sono stati riscontrati deficit in altri enzimi implicati nel metabolismo ossidativo, ad esempio nel complesso dell' α -chetoglutarato deidrogenasi (KGDH) e nel complesso della piruvato deidrogenasi (PDHC), due enzimi implicati nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) (Butterfield et al., 2008; Su et al, 2009). La diminuzione dell'attività di questi due enzimi può spiegare i deficit del metabolismo del glucosio riscontrati nell'encefalo di pazienti affetti da AD (Mancuso et al., 2009). Tutti i cambiamenti osservati nell'attività del ciclo di Krebs correlano con lo stato clinico della malattia suggerendo che questi possono causare un ridotto metabolismo cerebrale conducendo ad un declino delle funzioni cerebrali (Mancuso et al., 2009).

Anche i metalli di transizione giocano un ruolo importante nella patogenesi dell'AD; è stato riscontrato che il ferro (Fe), implicato nella formazione del radicale $\cdot\text{OH}$, tende ad accumularsi nel tessuto cerebrale ed è, per tale motivo, un importante fonte di stress ossidativo nei pazienti AD. Elevati livelli di Fe, sono stati infatti riscontrati nell'ippocampo, nella corteccia cerebrale e nei nuclei basali del Meynert di soggetti affetti da AD; inoltre, tale metallo tende a localizzarsi anche a livello delle placche senili (SP) e dei grovigli neurofibrillari (NFTs) (Su et al., 2009).

Recentemente, è stato osservato che il Fe è in grado di legarsi all'RNA, ossidandolo; in particolare è stato osservato che l'r-RNA fornisce un sito di legame per il Fe e agisce come centro redox all'interno del citoplasma dei neuroni che, nell'AD, sono maggiormente vulnerabili al danno da radicali liberi (Su et al., 2009).

Il rame (Cu) è un altro ione metallico, importante per la funzionalità di molti enzimi del metabolismo cerebrale e, per questo motivo, potrebbe essere implicato nella patogenesi della malattia (Su et al., 2009). È stato visto che anche il Cu gioca un ruolo importante nella generazione delle ROS attraverso il suo legame alla proteina β -amiloide ($A\beta$). Come per il Fe, vi è un aumento della concentrazione del Cu all'interno delle placche amiloidi: nei tessuti AD, la $A\beta$ lega il Cu e i complessi $A\beta$ -Cu diventano una sorgente di H_2O_2 riducendo il Cu^{2+} a Cu^+ . Un recente studio ha riportato che anche la proteina tau può essere in grado di legare il Cu e innescare un processo ossidativo (Su et al., 2009; Rival et al., 2009). Anche se il meccanismo con cui gli aggregati di $A\beta$ mediano la tossicità a livello cellulare non è ancora chiaro, ci sono pareri favorevoli sempre più crescenti che questi aggregati sono gli elementi patogenici dell'AD. Gli effetti tossici potrebbero essere indotti dal danno ossidativo a livello delle membrane o dall'interazione degli aggregati con le proteine di membrana (Rival et al., 2009).

La forma di $A\beta$ dannosa a livello cellulare risulta essere la $A\beta_{1-42}$, ma non la $A\beta_{1-40}$; Rival e collaboratori, nel 2009, hanno sviluppato un modello animale di AD facendo esprimere la forma umana di $A\beta$ nei neuroni della *Drosophila*, in tal modo questi ricercatori hanno mostrato che i moscerini che esprimono la forma $A\beta_{1-42}$, ma non quelli che esprimono la forma $A\beta_{1-40}$, tendono ad accumulare, nell'encefalo, il peptide, portando ad una diminuzione della vita e delle funzioni locomotorie del moscerino stesso. Gli studi di genetica e di analisi di microarray mettono in evidenza che lo stress ossidativo sia un evento centrale nella tossicità della $A\beta_{1-42}$. Questo è stato saggiato testando la risposta dei moscerini agli insulti ossidativi presentati aggiungendo il H_2O_2 al loro cibo. A seguito di questi esperimenti, è stato osservato che i moscerini che esprimono la forma della $A\beta_{1-42}$ sono più soggetti a morte se il

loro cibo è addizionato con H_2O_2 rispetto ai moscerini di controllo o a quelli che esprimono la forma $A\beta_{1-40}$ del peptide. Quando è stato quantificato il danno ossidativo, attraverso la misurazione dei livelli dei gruppi carbonilici degli estratti proteici del tessuto cerebrale di questi modelli di AD, i ricercatori hanno riscontrato che, i moscerini che esprimono la $A\beta_{1-40}$ presentano livelli di gruppi carbonilici simili ai moscerini di controllo, mentre i moscerini in cui era indotta l'espressione della $A\beta_{1-42}$, mostrano livelli doppi di carbonil proteine rispetto ai moscerini che esprimono la $A\beta_{1-40}$ (Rival et al., 2009).

Numerosi studi hanno mostrato che la $A\beta$ è una fonte di stress ossidativo in quanto induce l'ossidazione di diverse biomolecole, tra cui i lipidi di membrana e le proteine, attraverso la generazione, nei neuroni, del H_2O_2 e del HNE e induce danno al DNA e inattivazione di alcuni enzimi di trasporto (Su et al., 2009).

Molti studi hanno riportato un effetto tossico diretto della $A\beta$ su colture di neuroni; ad esempio, è stato mostrato che la $A\beta$ causa l'accumulo di H_2O_2 in colture di neuroni ipocampali e colture di neuroblastoma (Markesbery, 1996). Se questo effetto *in vitro* riflettesse la situazione *in vivo*, tale fenomeno potrebbe offrire un valido supporto all'ipotesi amiloidogena nella patogenesi dell'AD (Mancuso et al., 2009).

È stato dimostrato che la tossicità della $A\beta$, mediata dal H_2O_2 , sulle linee cellulari è prevenuta dagli antiossidanti come la vitamina E. Le linee cellulari che contengono alte concentrazioni di enzimi antiossidanti come le catalasi e la glutatione perossidasi sono resistenti alla tossicità indotta dalla $A\beta$ (Mancuso et al., 2009).

Ricordiamo che non solo l'aumento delle SRC, ma anche una diminuita funzionalità del sistema antiossidante contribuisce ad incrementare il danno da radicali liberi.

Molti studi con lo scopo di indagare la presenza di deficit nel sistema di difesa antiossidante, hanno messo in luce che, nel tessuto cerebrale di soggetti con AD, vi è un decremento dei livelli di m-RNA della Cu/Zn-SOD e una co-localizzazione delle Cu/Zn-SOD, delle Mn-SOD e delle catalasi con i NFTs, le formazioni caratteristiche riscontrate nell'encefalo di soggetti affetti da AD (Good et al., 1996).

Nel presente lavoro di tesi, al fine di valutare la presenza di danno ossidativo nell'AD e nel MCI, sono stati analizzati alcuni marker di stress ossidativo in pazienti affetti da tali patologie. A tale scopo sono stati valutati sia i livelli di alcune molecole pro-ossidanti, sia i livelli di alcune sostanze antiossidanti.

Per quanto riguarda le sostanze pro-ossidanti, sono stati valutati i prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP), un marker che permette di identificare, nel plasma, la presenza di danno ossidativo a livello delle proteine.

Gli AOPP consistono di un insieme di proteine, la tiroglobulina, la γ -globulina, l'albumina e la mioglobulina. In vivo, i livelli plasmatici degli AOPP correlano con i livelli dei dimeri di tiroxina, un marcatore dell'ossidazione proteica, e con la pentossidina, un marker di glicosilazione strettamente associato allo stress ossidativo (Witko-Sarsat et al., 1996).

La caratterizzazione biochimica, rivela l'esistenza di due picchi di peso molecolare distinti, a 670 e a 70 KDa, necessari per spiegare il livello totale degli AOPP. L'elettroforesi delle proteine mostra che il picco di AOPP ad alto peso molecolare è dovuto all'albumina che appare sottoforma di aggregati che derivano, probabilmente, da ponti disolfuro e /o dal cross-linking della tirosina.

Allo stesso modo, il picco degli AOPP a basso peso molecolare contiene l'albumina, ma nella sua forma monomeric. È stato dimostrato che l'albumina modificata dai processi di ossidazione conduce alla formazione degli AOPP; a riguardo sono possibili due tipi di interpretazioni: o la frazione degli AOPP a basso peso molecolare contiene albumina strutturalmente modificata ed ossidata, tale da rendere positivo il saggio degli AOPP o, in alternativa, gli AOPP a basso peso molecolare derivano da altre proteine plasmatiche (Witko-Sarsat et al., 1996).

L'analisi dei risultati del presente lavoro di tesi, mette in evidenza che la media dei valori degli AOPP determinata in tutti i pazienti, AD ed MCI, risulta essere più elevata della media riscontrata nei soggetti sani di controllo e tale differenza risulta statisticamente significativa. Anche dopo stratificazione per sesso, si osserva che i livelli plasmatici degli AOPP sono incrementati sia nelle pazienti di sesso femminile che nei pazienti di sesso maschile, se confrontati con i relativi controlli e tale differenza rimane statisticamente significativa per entrambe i sessi. Questi risultati confermano la presenza di danno ossidativo a livello della componente proteica del plasma dei pazienti affetti da AD e da MCI.

L'analisi dei dati effettuata sul confronto tra i pazienti AD contro i pazienti MCI, invece, non evidenzia una differenza apprezzabile nei livelli plasmatici degli AOPP, sia quando i due gruppi vengono analizzati nella totalità che quando vengono separati per sesso. Questi risultati fanno ipotizzare che potrebbe non esserci, almeno per tale marker di stress ossidativo, una differenza tra il danno ossidativo nell'AD e il danno nel MCI.

Riguardo ai meccanismi di difesa antiossidante sono stati valutati parametri quali la capacità ferro-riducente del plasma (FRAP) e i livelli del glutatione totale, su sangue intero.

Le medie dei valori di entrambe i parametri risultano minori nei pazienti rispetto ai controlli. Al valore della FRAP contribuiscono l'acido urico per il 60%, l'acido ascorbico per il 15 %, l' α -tocoferolo per il 5%, le proteine per il 10% e per il 5% la bilirubina.

La metodica che permette di determinare questo parametro di stress ossidativo, sfrutta le capacità di questi antiossidanti di ridurre il ferro, presente sottoforma di ione ferrico nel reattivo FRAP, a ione ferroso.

Dall'analisi dei risultati, si può osservare una differenza statisticamente significativa tra la media dei valori della FRAP dei pazienti (AD ed MCI) rispetto alla media dei valori dei controlli, sia prima che dopo stratificazione dei due gruppi in base al sesso. Dal confronto dei valori della FRAP dei pazienti con MCI rispetto ai pazienti AD, si osserva una differenza significativa quando si analizza la totalità dei due gruppi, ma dopo stratificazione in base al sesso, la significatività rimane invariata solo per i pazienti maschi, ma non per le pazienti donne.

Questi risultati sono in accordo con altri studi che confermano, nell'AD, una diminuzione della capacità antiossidante del plasma (Serra et al., 2001; Guidi et al., 2006) anche se, a riguardo, i dati presenti in letteratura risultano essere molto contrastanti: alcuni studi non trovano differenze statisticamente significative nella determinazione della FRAP e della TAC (capacità antiossidante totale) in soggetti AD se comparati con i rispettivi controlli (Zafrilla et al., 2006; Sekler et al., 2008), mentre altri mostrano un più basso livello della TAC plasmatica nei pazienti affetti da AD (Serra et al., 2001; Guidi et al., 2006).

Quando il gruppo dei soggetti con decadimento cognitivo lieve viene suddiviso in base alla scala globale di demenza (GDS), sono state trovate significative differenze nei livelli delle FRAP nel sottogruppo di pazienti presi in esame: i soggetti con uno stato di demenza moderato o severo, presentano una più bassa capacità antiossidante, saggiata mediante il metodo FRAP, rispetto ai controlli (Sekler et al., 2008).

Il danno ossidativo che si riscontra nei pazienti affetti da demenza può, in parte, essere promosso da una ridotta abilità del plasma a spazzare i radicali liberi. Il grado di stress ossidativo può essere direttamente connesso al progredire del decadimento cognitivo e dell'AD. Così, l'alta correlazione tra marker di stress ossidativo (FRAP) e decadimento cognitivo, indica che lo stress ossidativo potrebbe essere considerato un fattore di rischio nello sviluppo dei disordini cognitivi (Sekler et al., 2008).

Curiosamente, quando i soggetti vengono classificati sulla base del genotipo APO E, nella determinazione della TAC mediante il metodo delle FRAP, si riscontrano delle differenze significative solo nel gruppo dei soggetti con genotipo APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$, se confrontati con i controlli (Pulido et al., 2004; Sekler et al., 2008). I livelli della FRAP sono più bassi anche se il gruppo APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ viene comparato con i gruppi APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$ o APOE $\epsilon 3/\epsilon 4$; in effetti, i

soggetti con genotipo APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ hanno un rischio più alto di sviluppare AD, rispetto agli altri individui (Pulido et al., 2004).

Per tentare di spiegare l'esistenza di queste differenze, si può pensare che la FRAP dovrebbe essere analizzata in un contesto globale, assieme ad altri parametri biochimici e considerando le condizioni nutrizionali dei soggetti presi in esame (Sekler et al., 2008).

Il glutatione, il principale antiossidante presente nei sistemi viventi, deve la sua funzione alla presenza del gruppo sulfidrilico della cisteina che gli permette di interagire con le SRC. Il glutatione allo stato ridotto (GSH) agisce riducendo i radicali liberi e convertendosi in glutatione ossidato (GSSG), composto da un dimero di glutatione, unito da un ponte disolfuro.

Dall'analisi dei livelli del glutatione totale, su sangue intero di pazienti affetti da MCI ed AD, si osserva che vi è una diminuzione, statisticamente significativa, dei valori medi di tale marker di stress ossidativo se si mettono a confronto dei pazienti verso il gruppo dei controlli, sia prima che dopo stratificazione dei due gruppi in base al sesso.

Questi risultati sono in accordo con i dati presenti in letteratura i quali mostrano una diminuzione, rispetto ai controlli, dei livelli di GSH nei pazienti, sia maschi che femmine, affetti da AD (Aoyama et al, 2008; Calabrese et al, 2008; Bermejo et al., 2008); un altro studio, invece, riscontra livelli di GSH significativamente più bassi nei pazienti maschi, ma non nelle pazienti femmine con AD, complicando l'interpretazione del coinvolgimento del GSH nella patogenesi dell'AD (Ballatori et al., 2009).

Il confronto tra i pazienti AD versus i pazienti MCI, non evidenzia una differenza significativa nei livelli del glutatione, sia quando i due gruppi vengono analizzati nella totalità, sia quando vengono separati per sesso. Questi risultati sono in accordo con altri studi effettuati al fine di valutare il legame tra danno ossidativo, MCI e AD; infatti, Bermejo e collaboratori, nel 2008, dimostrano che i livelli di questo marker di stress ossidativo appaiono, nei pazienti MCI con un pattern simile a quello osservato nell'AD. Questo suggerisce che lo stress ossidativo potrebbe rappresentare un fattore di rischio per l'instaurarsi di disordini cognitivi che possono condurre allo sviluppo di patologie come MCI e AD. Al contrario, in base ai risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, sembra che lo stress ossidativo non sia coinvolto nel passaggio tra MCI ed AD che possono essere considerati, almeno da un punto di vista biochimico, equivalenti e lo sviluppo del MCI non conduce, necessariamente, a AD.

7. Conclusioni.

I dati ottenuti nel presente lavoro di tesi confermano l'esistenza di un'alterazione dell'equilibrio tra la produzione di sostanze ossidanti e l'attività del sistema di difesa antiossidante sia nei pazienti affetti da AD che nei pazienti affetti da MCI.

Tutti i parametri di stress ossidativo considerati, risultano modificati nei due gruppi di pazienti rispetto ai controlli, mentre non si osserva variazione dal confronto tra i due gruppi di pazienti, ad eccezione dell'analisi della capacità ferro riducente del plasma che rileva una differenza significativa tra i pazienti AD ed i pazienti MCI, quando questi vengono analizzati nella loro totalità e, dopo suddivisione in base al sesso, solo se si considerano i pazienti di sesso maschile.

Questi risultati avvalorano l'ipotesi di un possibile coinvolgimento dello stress ossidativo nelle malattie neurodegenerative e in particolare nell'AD e nel MCI, ma sarebbe opportuno condurre delle ulteriori ricerche per avvalorare l'ipotesi del ruolo dello stress ossidativo nella patologia delle malattie cognitive. Questi risultati, però, non devono essere letti in modo assoluto in quanto il campione analizzato è relativamente di piccole dimensioni; gli esiti ottenuti quindi, possono essere letti solo come indicazioni di un'associazione tra l'aumento dello stress ossidativo e la patogenesi di queste malattie. Sono necessari, di conseguenza, studi futuri che analizzino un campione di dimensioni maggiori e che siano finalizzati alla valutazione di altri marker di stress ossidativo al fine di definire se il danno ossidativo sia una causa o una conseguenza immediata della patogenesi di queste malattie e se esistono e quali sono le reali differenze, da un punto di vista biochimico, tra il MCI e l'AD.

8. Bibliografía.

Abilés J., Pérez de la Cruz A., Castaño J, Rodríguez-Elvira M. et al. (2006). *Oxidative stress is increased in critically ill patients according to antioxidant vitamins intake, independent of severity: a cohort study*. Critical Care, 10:R146.

Aoyama K., Watabe M., Nakaki T. (2008). *Regulation of Neuronal Glutathione Synthesis*. J Pharmacol Sci 108, 227–238.

Baker MA., Cerniglia GJ., Zaman A. (1990). *Microtiter plate for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples*. Anal Biochem.; 190(2): 360-365.

Ballatori N., Krance SM., Notenboom S., Shi S., Tieu K., Hammond CL. (2009). *Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases*. Biol Chem.; 390(3): 191–214.

Bandyopadhyay B., Li G., Yin H., Kuret J. (2007). *Tau Aggregation and Toxicity in a Cell Culture Model of Tauopathy*. The journal of biological chemistry; 282(22):16454–64.

Benzie IF., Strain JJ. (1996). *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay*. Anal Biochem.; 239(1): 70-76.

Bermejo P., Martín-Aragón S., Benedí J., Susín C., Felici E., Gil P., Ribera JM. Ma Villar Á. (2008). *Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment*. Free Radical Research; 42(2):162-170.

Bird TD. (2008). *Genetic Aspects of Alzheimer Disease*. Genet Med.; 10(4): 231–239.

Butterfield DA., Reed T., Newman SF., Sultana R. (2007). *Roles of Amyloid β -Peptide-Associated Oxidative Stress and Brain Protein Modifications in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment*. Free Radic Biol Med.; 43(5): 658–677.

Calabrese V, Sultana R, Scapagnini G, Guagliano E, Sapienza M, Bella R, Kanski J, Pennisi G, Mancuso C, Stella AM, Butterfield DA. (2006). *Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease*. Antioxid Redox Signal; 8(11-12):1975-86.

Castellani RJ., Lee H., Zhu X., Perry G., Smith MA. (2009). *Alzheimer's Disease pathology as a host response*. *J Neuropathol Exp Neurol*. 67(6): 523–531.

Chertkow H., Massoud F., Nasreddine Z. (2008). *Diagnosis and treatment of dementia: 3. Mild cognitive impairment and cognitive impairment without dementia*. *CMAJ*; 178(10): 1273-85.

Christen Y. (2000). *Oxidative stress and Alzheimer disease*. *Am J Clin Nutr*;71(suppl):621S–9S.

Clodfelder-Miller BJ., Zmijewska AA., Johnson GVW., Jope RS. (2006). *Tau Is Hyperphosphorylated at Multiple Sites in Mouse Brain In Vivo After Streptozotocin Induced Insulin Deficiency*. *Diabetes* 55:3320–3325.

Coppedè F., Migliore L. (2009). *DNA damage and repair in Alzheimer's disease*. *Curr Alzheimer Res.*;6(1):36-47. Review.

Corti A., De Tata V., Pompella A. (2009). *Agenti e meccanismi di stress ossidativo nella patologia umana*. *Ligand Assay* 14 (1): 9-16.

Danielson P. (2002). *The cytochrome P450 superfamily: Biochemistry, evolution and drug metabolism in humans*. *Curr Drug Metab* 3(6): 561-97.

Du Y., Wooten MC., Gearing M., Wooten MW. (2009). *Age-Associated Oxidative Damage to the p64 Promoter: Implication for Alzheimer's Disease*. *Free Radic Biol Med*. 46(4): 492-501.

Fasulo L, Ugolini G, Cattaneo A. (2005). *Apoptotic effect of caspase-3 cleaved tau in hippocampal neurons and its potentiation by tau FTDP-mutation N279K*. J Alzheimers Dis; 7(1):3-13.

Fukui H., Diaz F., Garcia S., Moraes CT. (2007). *Cytochrome c oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease*. The National Academy of Sciences; 104(35): 14163-68

Gandy S. (2005). *The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease*. J. Clin. Invest. 115:1121–1129.

Good PF., Werner P., Hus A., Olanow CW., Perl DP. (1996). *Evidence for Neuronal Oxidative Damage in Alzheimer's Disease*. Am J Pathol 149: 21-28.

Govoni S., Pelosi C., Racchi M. (2001). Stress ossidativo, demenza e invecchiamento: i confini incerti di un continuum biologico di difficile valutazione.

Guidi I., Galimberti D., Lonati S., et al. (2006). *Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's Disease*. Neurobiol Aging, 27:262-9.

Hansson O., Zetterberg H., Buchhave P., Londos E., Blennow K., Minthon L. (2006). *Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a followup study*. Lancet Neurol; 5(3):228–234.

Iorio EL. (2006). *Specie chimiche reattive e radicali liberi*. Convegno “Radicali liberi e antiossidanti in medicina nello sport”

Irvine GB., El-Agnaf OM., Shankar GM., Walsh DM. (2008). *Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases*. Mol Med;14 (7-8) 451-464.

Izawa S, Inoue Y, Kimura A. (1996). *Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J. Nov 15;320 (Pt 1):61-7

- Jha R., Rizvi SI. (2009). *Age-dependent decline in erythrocyte acetylcholinesterase activity: correlation with oxidative stress*. Biomed pap Med; 153(3): 195-198.
- Kelley BJ., Petersen RC. (2007). *Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment*. Neurol Clin: 25(3): 577–v.
- Kennard ML., Feldman H., Yamada SS., Jefferies WA. (1996). *Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease*. Nat Med; 2: 1230-5.
- Kidd PM. (2005). *Alzheimer's Disease, Amnesic Mild Cognitive Impairment, and Age Associated Memory Impairment: Currentm Understanding and Progress Toward Integrative Prevention*. Altern Med Rev;13(2):85-115.
- Ladeira RB., Diniz BS., Nunes PV., Forlenza OV. (2009). *Combining cognitive screening tests for the evaluation of mild cognitive impairment in the elderly*. Clinics; 64(10): 967-73.
- Lambert JC., Amouyel P. (2007). *Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: Complexity and advances*. Psychoneuroendocrinology; 32: 62-70.
- Liang WS, Reiman EM, Valla J. Et al. (2008). *Alzheimer's Disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons*. Proc Natl Acad Sci USA; 105: 4441-4446.
- Liu CY., Lee CF., Wei YH. (2009). *Role of Reactive Oxygen Species-elicited Apoptosis in the Pathophysiology of Mitochondrial and Neurodegenerativen Diseases Associated With Mitochondrial DNA Mutations*. J Formos Med Assoc ; 108(8): 599–611.
- Longo FM. and Massa SM. (2004). *Neuroprotective Strategies in Alzheimer's Disease*. The American Society for Experimental NeuroTherapeutics; 1: 117-127.
- Lovell MA., Markesbery WR. (2007). *Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease*. Nucleic Acids Research, Vol. 35, No 22: 7497–7504

Maiese K., Chong ZZ., Hou J., Shang YC (2008). *Erythropoietin and Oxidative Stress*. Curr Neurovasc Res. 5(2): 125–142.

Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G., Murri L. (2006). *Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration*. J Alzheimers Dis 10, 59–73.

Mancuso M., Orsucci D., Lo Gerfo A., Casolaro V., Siciliano G. (2009). *Clinical Features and Involvement of Mitochondrial DNA in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease*.

Mariani E., Polidori MC., Cherubini A., Mecocci P. (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. Journal of Chromatography B, 827 65–75

Markesbery WR. (1996). *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 23, No. 1: 134–147.

McCord JM. (2000). *The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress*. AmJ Med.;108:652–659.

Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. (2009). *Neurobiology of Alzheimer's disease*. Indian J Psychiatry; 51:55-61.

Migliore L., Fontana I., Trippi R. et al. (2005). *Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients*. Neurobiology of Aging: 567-573.

Morris JC., Storandt M., Mckeel DW., et al. (1996). *Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in normal aging: Evidence for preymptomatic and very mild Alzheimer's disease*. Neurol; 46: 707-719.

Mosconi L., Pupi A. De Leon MJ. (2008). *Brain Glucose Hypermetabolism and Oxidative Stress in Preclinical Alzheimer's Disease*. Ann N Y Acad Sci. 1147: 180-195.

Padovani A. (2005). *La diagnosi preclinica delle demenze*. Neurol Sci 26:141–143.

Panza F., Solfrizzi V., Capurso C. et al. (2001). *Alimentazione, stress ossidativo e declino cognitivo*. Dementia Update.

Perry G., Cash AD., Smith MA. (2002). *Alzheimer Disease and Oxidative Stress*. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2:3 120–123.

Petersen RC. and Negash S. (2008). *Mild Cognitive Impairment: An Overview*. CNS Spectr.;13(1):45-53.

Petersen RC., Smith GE., Ivnik RJ., et al. (1995). *Apolipoprotein E status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals*. Jama; 273(16):1274–1278.

Price JL., Ko AI., Wade MJ., et al. (2001). *Neuron number in the enthorinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer's disease*. Arch Neurol; 58:1395-1402.

Pulido R., Jiménez-Escrig A., Orensanz L., Saura-Calixto F., Jiménez-Escrig A. (2005). *Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease*. European Journal of Neurology; 12: 531–535.

Rahman K. (2007). *Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors*. Clinical Interventionsentions in Aging;2(2): 219–236.

Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. (1997). *Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms*. Horm Metab Res. Aug;29(8):363-72.

Ries ML., Carlsson C., Rowley H., Sager M., Gleason C., Asthana S., Johnson S. (2008). *MRI characterization of brain structure and function in Mild Cognitive Impairment: A review*. J Am Geriatr Soc.; 56(5): 920–934.

Rival T., Page RM., Chandraratna DS., et al., (2009). *Fenton chemistry and oxidative stress mediate the toxicity of the β -amyloid peptide in a Drosophila model of alzheimer's disease*. European Journal of Neuroscience; 29: 1335-1347.

Rosenberg PB., Lyketsos CG. (2008). *Mild cognitive impairment: searching for the prodrome of Alzheimer's disease*. World Psychiatry;7:72-78.

Rountree SD., Chan W., Pavlik VN., et al. (2009). *Persistent treatment with cholinesterase inhibitors and/or memantine slows clinical progression of Alzheimer disease*. Alzheimer's Reserch & Therapy; 1:7.

Satler Diniz B., Villela Nunes P., Yassuda MS., FS. Pereira, Flaks MK., Viola LF., Radanovic M., Dutra de Abreu I., Borelli DT., Gattaz WF., Forlenza OV. (2008). *Mild cognitive impairment: cognitive screening or neuropsychological assessment?* Rev Bras Psiquiatr.;30(4):316-21.

Sayre LM., Moreira PI., Smith MA., Perry G. (2005). *Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease*. Ann Ist Super Sanità;41(2):143-164.

Sekler A., Jiménez JM., Rojo L., et al. (2008). *Cognitive impairment and Alzheimer's disease: Links with oxidative stress and cholesterol metabolism*. Neuropsychiatric Disease and Treatment; 4(4): 715-722.

Serra JA, Dominguez RO, de Lustig ES, et al., (2001). *Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients*. J Neural Transm, 108:1135-48.

Siciliano G., Piazza S., Carlesi C., et al. (2007). *Antioxidant capacity and protein oxidation in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurol; 254:575-80.

Sompol P., Ittarat W., Tangpong J., Chen Y., Doubinskaia I., Batinic-Haberle I., Mohammad HA, Butterfield DA., St. Clair DK. (2008). *A neuronal model of Alzheimer's disease: An insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury*. Neuroscience. 153(1): 120–130.

Sonnen JA., Montine KS., Quinn JF., Kaye JA., Breitner JC.S., Montine TJ. (2008). *Biomarkers for cognitive impairment and dementia in elderly people*. Lancet Neurol.; 7(8): 704–714.

Sorbi S., Massaro F. (2004). *Neurodegenerazione nelle demenze e amiloidosi*. *Neurol Sci* 25:619-621.

Stephan BCM., Matthews FE., Khaw KT., Dufouil C., Brayne C. (2009). *Beyond mild cognitive impairment: vascular cognitive impairment, no dementia (VCIND)*.

Su B., Wang X., Nunomura A., Moreira PI, et al. (2008). *Oxidative stress signaling in Alzheimer's Disease*. *Curr Alzheimer Res.*; 5(6): 525-532.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR (2000). *Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products* . *Biological signals and receptors* 9 (3-4): 137-59.

Tierney MC., Szalai JP., Snow WG., et al. (1996). *A prospective study of the clinical utility of ApoE genotype in the prediction of outcome in patients with memory impairment*. *Neurology*; 46(1):149–154.

Tietze F. (1969). *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissue*. *Anal Biochem.*; 27(3): 502-522.

Uttara B., Singh AV., Zamboni P., Mahajan RT. (2009). *Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options*. *Current Neuropharmacology*; 65-74.

Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. *Chemico-Biological Interactions*;160:1–40.

Werner P. and Korczyn AD. (2008). *Mild cognitive impairment: Conceptual, assessment, ethical, and social issues*. *Clinical Interventions in Aging*; 3(3): 413–420.

Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillere-Blandin C. et al. (1996). *Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia*. *Kidney Int.*; 49(5): 1304-1313.

Zafrilla P., Mulcro J., Xandri JM, et al. (2006). *Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease*. *Curr Med Chem*, 13:1075-83.

9. Ringraziamenti.

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno contribuito al raggiungimento di questo traguardo.

Un grazie particolare va al Professor Siciliano per la disponibilità dimostratami durante il lavoro di tesi.

Ringrazio, inoltre, tutti i componenti del laboratorio di Neurobiologia clinica e Neurochimica della Clinica Neurologica, in modo particolare la Sig. Baroni, il Sig. Bacci, la Dottoressa Petrozzi, la Dottoressa Nesti, il Dottor Mancuso e la Dottoressa Rocchi per l'affetto e la fiducia dimostratami durante la mia permanenza in laboratorio.

Ringrazio, inoltre, la Dottoressa Lo Gerfo per la partecipazione alla stesura di questo lavoro e per la stima dimostratami.