



UNIVERSITÀ CAMPUS BIO-MEDICO DI ROMA
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOCHIMICHE E TECNOLOGICHE
XXVIII CICLO ANNO 2013

**STUDIO DELLA SUSCETTIBILITÀ ALLO STRESS
OSSIDATIVO DI MEMBRANE ERITROCITARIE
PURIFICATE, IN SOGGETTI AFFETTI DA MALATTIA DI
ALZHEIMER**

Relatore

Prof. Raffaele Antonelli Incalzi

Dottorando

Dott. Francesco Maria Serino

11 Marzo 2016

Digitally signed by SERINO
FRANCESCO MARIA
C=IT
O= non presente

Tesi di dottorato in Scienze biochimiche e tecnologiche applicate agli alimenti ed alla nutrizione, di Francesco Maria Serino, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.



Documento firmato digitalmente da Francesco-Maria Serino

INDICE

1 - LA MALATTIA DI ALZHEIMER

1.1 - Epidemiologia

1.2 - Fattori di rischio

1.3 - Patogenesi

2 - RADICALI LIBERI E INVECCHIAMENTO

2.1 - Danno da ROS

2.2 - ROS come molecole di segnale

3 - INVECCHIAMENTO, STRESS OSSIDATIVO E MALATTIA DI ALZHEIMER

4 - ACIDI GRASSI POLINSATURI E CERVELLO

5 - REVISIONE DELLA LETTERATURA SU LIPOPEROSSIDAZIONE E MALATTIA DI ALZHEIMER

6 - TRASPONIBILITA` A LIVELLO CENTRALE DI RISULTATI PERIFERICI

7 - OBIETTIVI

8 - DISEGNO, MATERIALI E METODI

8.1 - Popolazione

8.2 Criteri di inclusione

8.3 Criteri di esclusione

8.4 - Dosaggio della MDA prodotta dalle membrane eritrocitarie sottoposte a foto-ossidazione

8.5 - Caratterizzazione degli acidi grassi di membrana

8.6 - VALUTAZIONE DELLO STATO COGNITIVO

9 - RISULTATI

9.1 Analisi descrittiva

9.2 - Dosaggio della MDA

9.3 - Analisi lipidomica: caratterizzazione degli acidi grassi di membrana eritrocitaria

9.3.1 - ACIDO PALMITICO (16:0)

9.3.2 - ACIDO STEARICO (18:0)



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

Tesi di dottorato in Scienze biochimiche e tecnologiche applicate agli alimenti ed alla nutrizione, di Francesco Maria Serino, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.

La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

[9.3.3 - ACIDO PALMITOLEICO \(16:1 \$\Delta\$ 9\)](#)

[9.3.4 - ACIDO OLEICO \(18:1 \$\Delta\$ 9\)](#)

[9.3.5 - ACIDO VACCENICO \(18:1 \$\Delta\$ 11\)](#)

[9.3.6 - ACIDO LINOLEICO \(18:2- \$\Delta\$ 9,12\)](#)

[9.3.7 - ACIDO DIOMO- \$\gamma\$ -LINOLENICO \(DGLA; 20:3\)](#)

[9.3.8 - ACIDO ARACHIDONICO \(AA; 20:4\)](#)

[9.3.9 - ACIDO EICOSAPENTAENOICO \(EPA; 20:5\)](#)

[9.3.10 - ACIDO DOCOSAESAENOICO \(DHA; 22:6\)](#)

[9.3.11 - ACIDI GRASSI TRANS \(trans-18:1 - acido elaidico\)](#)

[10 - DISCUSSIONE](#)

[11 - CONCLUSIONI](#)

[ALLEGATI - TABELLE E FIGURE](#)

[Ringraziamenti](#)

[BIBLIOGRAFIA](#)



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

1 - LA MALATTIA DI ALZHEIMER

La malattia di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa progressiva e irreversibile che colpisce vaste aree della corteccia cerebrale e dell'ippocampo. Le alterazioni sono di solito rilevate più precocemente nel tessuto cerebrale che coinvolge i lobi frontale e temporale, per poi progredire lentamente ad altre aree della neocorteccia, con una velocità di progressione variabile da individuo a individuo. Da un punto di vista anatomopatologico è tipico l'accumulo di forme insolubili di proteina beta amiloide ($A\beta$) in placche presenti negli spazi extracellulari e nelle pareti dei vasi sanguigni. E' inoltre caratteristica l'aggregazione della proteina tau, presente nei microtubuli, in grovigli neurofibrillari all'interno dei neuroni. $A\beta$ deriva dal clivaggio proteolitico della proteina precursore dell'amiloide (APP) da parte di una complessa famiglia di enzimi (γ -secretasi e β -secretasi) che include la presenilina 1 (PS1, codificata dal gene PSEN1) e presenilina 2 (PS2, codificata dal gene PSEN2). La durata media della malattia è di 8-10 anni, ma le fasi clinicamente sintomatiche sono precedute da una fase preclinica che in genere si estende su due decenni. La malattia sporadica di Alzheimer è la più comune ed ha una età media di insorgenza di 80 anni. La patogenesi è stata individuata nell'incapacità di eliminare il peptide $A\beta$ dal tessuto cerebrale. Tuttavia, comorbidità quali la malattia cerebrovascolare e la sclerosi ippocampale sono frequenti a queste età, il che complica la diagnosi e la gestione. Una storia familiare di Alzheimer non è insolita nella malattia sporadica, ma solo una piccola percentuale (<1%) dei pazienti sono affetti dalla forma ereditaria autosomica dominante. Questa forma ha un'età precoce di insorgenza (età media di ~ 45 anni), ed è caratterizzata da mutazioni nei geni che codificano per APP, PS1 e PS2 che causano una sovrapproduzione o la formazione di una forma aberrante di $A\beta$. Molti aspetti clinici accomunano le forme sporadiche e familiari della malattia di



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

Alzheimer, in particolare la velocità di progressione della malattia e i diversi biomarkers.

1.1 - Epidemiologia

La epidemiologia descrittiva della malattia di Alzheimer è stata oggetto di molti studi negli ultimi 30 anni. Purtroppo, la maggior parte di questi hanno un valore limitato dall'elevato numero di variabili confondenti, in particolare le diverse comorbidità (la malattia cerebrovascolare innanzitutto, che è l'elemento di confusione principale degli studi di epidemiologia descrittiva). Anche se molti studi descrittivi di 'demenza' offrono una stima globale del livello di deterioramento cognitivo nella popolazione anziana, le stime riportate di incidenza e prevalenza della malattia di Alzheimer, al contrario della demenza generica, devono essere interpretate con cautela. Analogo discorso può essere fatto con le associazioni di volta in volta individuate con fattori di rischio. Fortunatamente, le tecnologie biomediche in grado di arrivare ad una diagnosi clinica precisa di malattia di Alzheimer, stanno diventando sempre più disponibili (su tutti la PET molecolare e i livelli di biomarkers - A β e tau - nel liquido cefalorachidiano - CSF), e permetteranno stime sempre più accurate della prevalenza e dell'incidenza di questa malattia ¹ ². Si ritiene che l'incidenza media complessiva della malattia di Alzheimer sia del 1-3% e ciò è coerente con una prevalenza del 10-30% nella popolazione di età superiore a 65 anni (dal momento che la durata media della malattia di Alzheimer è di 10 anni). Esistono poche cifre attendibili sulla specifica incidenza della malattia di Alzheimer nelle persone di età superiore ai 90 anni, sebbene a ben vedere questa informazione sia fondamentale per meglio comprendere la questione di come la neurodegenerazione si rapporti al normale processo di invecchiamento del cervello. Si sostiene spesso che la malattia di Alzheimer sia un inevitabile conseguenza dell'invecchiamento, e che tutte le persone, al di sopra di 90



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

anni di età, mostrino una qualche forma di evidenza prodromica della malattia clinica. Tuttavia, come si è visto in studi post mortem, la prevalenza della malattia di Alzheimer tende a ridursi dopo i 98 anni di età, al contrario di altre malattie neurodegenerative (come la sclerosi ippocampale) che invece aumentano ³. Se ciò è corretto, sarebbe lecito allineare il morbo di Alzheimer ad altre condizioni neurodegenerative, come il morbo di Parkinson, in cui si ha un picco di incidenza chiaramente definibile tra i 70 e 90 anni di età dopo del quale si assiste ad un decremento netto ⁴. La malattia di Alzheimer, così come altre demenze non specificate, sono più frequenti nelle donne rispetto agli uomini; in uno studio australiano è stato osservato che circa il 66% dei decessi dovuti alla demenza è costituito da donne ⁵. Contrariamente alle stime catastrofiche degli ultimi anni, in un lavoro apparso sul New England Journal of Medicine, sono state mostrate robuste evidenze circa un declino della incidenza della malattia di Alzheimer. Utilizzando i dati raccolti nel Framingham Heart Study dal 1975 ad oggi, è stata dimostrata una diminuzione del 20% dell'incidenza di demenza per ogni decennio, nonostante l'indice di massa corporea, la prevalenza di diabete e l'età della popolazione siano aumentate ⁶.

L'affinamento e l'utilizzo delle nuove tecnologie per la diagnosi di demenza di Alzheimer (in particolare l'imaging tramite PET e il dosaggio dei livelli di A β nel CSF) aiuteranno a stabilire con più precisione l'incidenza di Alzheimer e, applicate agli studi di epidemiologia analitica, permetteranno forse un progresso significativo nella nostra comprensione del ruolo reciproco di genoma e ambiente nella eziologia di questa malattia. Le evidenze attuali suggeriscono che la forma sporadica del morbo di Alzheimer si verifichi con la stessa incidenza in tutte le diverse popolazioni geografiche, un dato questo che, se confermato, rafforzerebbe la preminenza del genoma nell'eziologia della malattia ⁷.



1.2 - Fattori di rischio

Diversi fattori di rischio potenzialmente modificabili, sono stati individuati per la malattia di Alzheimer. Tra questi il diabete mellito (rischio relativo (RR): 1,46; 95% CI: 1,20-1,77), ipertensione insortà nella mezza età (RR: 1.61; 95% CI: 1,16-2,24), obesità insorta nella mezza età (RR: 1,60; 95% CI: 1,34-1,92), mancanza di attività fisica (RR: 1,82; 95% CI: 1,19-2,78), depressione (RR: 1,65; 95% CI: 1,42-1,92), fumo (RR: 1,59; 95% CI: 1,15-2,20) e basso livello d'istruzione (RR: 1.59; 95% CI: 1,35-1,86) ⁸. La maggior parte di questi fattori di rischio sono coinvolti anche nella malattia cerebrovascolare aterosclerotica, pertanto rimane incerta la potenzialità di ciascun fattore nel mitigare l'età di insorgenza o la gravità della progressione della malattia di Alzheimer. In termini di strategie di prevenzione primaria e secondaria, ciascuna di queste variabili necessita ancora di una ulteriore valutazione in studi adeguatamente controllati, in pazienti cui sia stata correttamente diagnosticata la malattia. Studi interventistici multidominio che agiscano su stile di vita, dieta, esercizio fisico e cognitivo e prevenzione del rischio cardiovascolare (come ad esempio lo studio DITO finlandese), hanno dimostrato miglioramenti in alcune misurazioni cognitive, ma non affrontano direttamente la questione se la malattia di Alzheimer di per sé sia modificabile o prevenibile in questo modo. ⁹ Nonostante l'incertezza sui fattori di rischio ambientale per la malattia di Alzheimer sporadica, un fattore di rischio genetico consolidato, e ritenuto chiave. è presente in tutti gli studi: il polimorfismo associato con il gene codificante l'apolipoproteina E (APOE), il quale ha un effetto importante nel determinare l'età di insorgenza della malattia di Alzheimer.

1.3 - Patogenesi

Attualmente A β , APOE e tau sono i tre elementi su cui convergono le



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

maggiori prove concrete di coinvolgimento nella patogenesi della malattia di Alzheimer. Le caratteristiche neuropatologiche e neurochimiche della malattia di Alzheimer sono la morte neuronale selettiva, il depauperamento sinaptico, la diminuzione specifica di alcuni neurotrasmettitori e la presenza di depositi proteici anomali all'interno dei neuroni (chiamati grovigli neurofibrillari) e nello spazio extracellulare (placche neuritiche).^{10,11}

Si ritiene che il peptide A β abbia un ruolo patogenetico nella malattia di Alzheimer. A β -presente nelle placche- viene scisso da APP in un gruppo eterogeneo di peptidi di varia lunghezza (tra i 38 ed i 43 aminoacidi) e peculiarità.¹² Si ritrovano inoltre isoforme modificate o troncate a livello N-terminale. Diversi studi hanno dimostrato che A β è un normale prodotto del metabolismo di APP ed è generata ad alti livelli nei neuroni, ma anche da altri tipi cellulari, in diverse fasi della vita di ogni individuo. La funzione neuronale di APP rimane sconosciuta, ma potrebbe avere a che fare con la plasticità sinaptica. L'accumulo di A β e un cambiamento di conformazione a forme con una struttura β a pieghe, è centrale nella patogenesi della malattia di Alzheimer.¹³ Le prove più convincenti circa il ruolo di A β nella malattia di Alzheimer derivano dallo studio di soggetti con forme ereditarie ad insorgenza precoce. Le mutazioni in uno dei tre diversi geni (APP, PSEN1 e PSEN2) sono evidenti in più della metà dei pazienti affetti da queste forme. La maggior parte delle mutazioni provoca la sovrapproduzione di A β , in particolare l'isoforma a 42 aminoacidi A β 42, che è più incline a formare aggregati (c.d. amiloidogenicità). La maggior parte delle mutazioni di APP alterano il suo processamento in modo tale che il rapporto tra A β 42 e A β 40 aumenti nel plasma dei pazienti affetti da malattia¹⁴. Inoltre, le mutazioni di PSEN1 e PSEN2 sono in grado di determinare un aumento del rapporto A β 42 / A β 40.¹⁵ Oltre che nelle forme ereditarie di malattia di Alzheimer, anche nella sindrome di Down, la presenza di APP sulla copia extra del cromosoma 21, si traduce in un aumento della produzione di A β ; gli individui sviluppano conseguentemente tutti i cambiamenti patologici che ricordano la malattia

di Alzheimer entro i 35 anni di età.¹⁶ Altra prova è data dal fatto che una mutazione nota di APP, in grado di ridurre la produzione di A β , ha dimostrato avere effetti protettivi dall'insorgenza tardiva della malattia di Alzheimer.¹⁷

APOE sul cromosoma 19 è il singolo fattore di rischio genetico più associato all'insorgenza della malattia di Alzheimer. APOE è coinvolto nel normale catabolismo delle lipoproteine ad alto contenuto di trigliceridi. Una delle prime osservazioni che hanno collegato APOE alla malattia di Alzheimer è stata l'immunoreattività di APOE nei depositi di A β e nei grovigli neurofibrillari.¹⁸ APOE è una proteina costituita da 299 aminoacidi, presente in tre isoforme nell'uomo che differiscono tra loro solo per 1 o 2 aminoacidi: APOE2 (Cys112 e Cys158), APOE3 (Cys112 e Arg158) e APOE4 (Arg112 e Arg158). La prevalenza per ogni allele è del 7% per APOE2, 78% per APOE3 e 15% per APOE4 in soggetti americani di origine europea.¹⁹ Le sostituzioni aminoacidiche influiscono sulla carica e sulla struttura di APOE, alterando il legame sia per i recettori cellulari sia per le particelle delle lipoproteine, con conseguente alterazione della stabilità e della velocità di produzione e clearance. APOE viene espressa in maniera elevata a livello del cervello, dove viene prodotta principalmente da astrociti e, in misura ridotta, dalla microglia.²⁰ In determinate condizioni, una parte della produzione di APOE può verificarsi nei neuroni.²¹ L'APOE cerebrale origina esclusivamente all'interno della barriera ematoencefalica ed è presente nel CSF a concentrazioni di circa 5 μ g/mL.²² Gli studi di popolazione hanno ampiamente dimostrato che APOE4 aumenta il rischio di sviluppare la malattia di Alzheimer (la presenza di un allele conferisce un aumento di 3 volte del rischio e la presenza di due alleli conferisce un aumento del rischio di 12 volte) ed è anche associata ad una più precoce età di insorgenza della stessa.²³ Viceversa, APOE2 diminuisce il rischio di sviluppare la malattia.²⁴ L'allele APOE4 è stato stimato che possa contribuire per circa il 50% nelle forme sporadiche di malattia di Alzheimer.²⁵ Il meccanismo attraverso cui APOE4 contribuisca



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

alla patogenesi della malattia di Alzheimer è stato studiato attraverso colture cellulari e studi su animali transgenici. L'isoforma APOE4 non altera la sintesi di A β , ma può aumentare notevolmente la deposizione di A β in modelli animali di malattia di Alzheimer.^{26,27} Il numero di alleli APOE4 è associato in maniera dose-dipendente ad un aumento della densità di depositi di A β , e ad angiopatia amiloide nel cervello di pazienti con malattia di Alzheimer. APOE si trova legata ad A β nei fluidi biologici ed è associata ad A β fibrillare che si ritrova in frammenti di tessuto cerebrale di pazienti con malattia di Alzheimer. Questi studi indicano che APOE è un importante fattore causale che contribuisce all'insorgenza della malattia di Alzheimer, agendo come chaperone per A β , modificandone clearance e deposizione, giocando così un ruolo importante nella formazione delle placche. Finora non è stata trovata alcuna prova conclusiva in favore del coinvolgimento di APOE4 nella fosforilazione della proteina tau o nel metabolismo.

Le cosiddette taupatie, definite come quelle malattie neurodegenerative con aggregazione di proteina tau nel cervello, costituiscono la manifestazione patologica più comune nelle varie patologie neurodegenerative. La comprensione della trasformazione della proteina tau da normale in quella patologica nelle varie taupatie, è centrale per capire come essa contribuisca alla malattia e per lo sviluppo di terapie mirate. Molti studi hanno dimostrato che la proteina tau totale (Ttau; tutte le isoforme indipendentemente dallo stato fosforilativo) e la proteina tau fosforilata (Ptau; tau con fosforilazione a livello dei residui 181 o 231) presentano livelli aumentati sia nel cervello sia nel CSF di pazienti con la malattia di Alzheimer.²⁸ Le taupatie vengono classificate in base alle specifiche isoforme tau che risultano aumentate.^{29,30} Il meccanismo di aumento degli aggregati tau (se siano cioè dovuti ad aumentata produzione o a clearance ridotta) non è ad oggi noto. L'emivita di tau nel sistema nervoso centrale umano, la sua cinetica nella malattia di Alzheimer sono questioni tuttora aperte.



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

Fino ad oggi, nessuna singola ipotesi proposta è riuscita a racchiudere completamente sia gli aspetti clinici che quelli anatomo-patologici della malattia di Alzheimer. Tuttavia, un evento precipitante, in grado di suscitare molteplici cascate secondarie potrebbe aiutare a spiegare la natura multiforme della patogenesi. Una particolare ipotesi di questo tipo che ha riscosso notevole interesse è l'ipotesi del danno ossidativo, un'estensione della teoria dell'invecchiamento dovuta ai radicali liberi.³¹

2 - RADICALI LIBERI E INVECCHIAMENTO

Risale ad oltre un secolo addietro l'osservazione che gli animali con tassi metabolici più elevati hanno spesso durata di vita più breve. Fu quindi formulata un'avvicente ipotesi: il tasso metabolico di una specie è ciò che in ultima analisi determina la sua aspettativa di vita. Da principio, il legame meccanicistico tra metabolismo e invecchiamento era del tutto ignoto. Nel 1954 Rebecca Gershman collegò per prima l'effetto tossico dell'ossigeno alla formazione di radicali liberi.³² Due anni dopo, Denham Harman avanzò la c.d. 'Teoria dei radicali liberi' ipotizzando che radicali dell'ossigeno, generati nelle cellule, possano indurre un danno cellulare e che questo danno possa essere progressivamente cumulativo.³¹ Il concetto di ossidanti endogeni risultò in un primo momento controverso e poco interessante per la comunità scientifica. Diversi anni dopo McCord e Fridovich purificarono per primi un enzima da eritrociti bovini, la cui unica funzione sembrava essere quella di catalizzare la dismutazione dell'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$) ad ossigeno molecolare e perossido di idrogeno: la superossido dismutasi (SOD)³³. Il radicale superossido era stato scoperto negli anni 1930 da Linus Pauling ma era risultato di interesse unicamente per i chimici. I radicali liberi sono stati infatti a lungo considerati specie ad emivita troppo breve per poter svolgere un ruolo nei processi vitali. Si può affermare che la scoperta della SOD creò un ponte tra la chimica dei radicali liberi, la biologia e la medicina.



Documento firmato digitalmente da Francesco-Maria Serino

Dato che il mitocondrio produce la maggior parte dell'energia cellulare, e corrispondentemente consuma l'ossigeno intracellulare, la teoria dell'invecchiamento basata sui radicali liberi afferma che maggiore è il tasso metabolico di un organismo, maggiore è la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e quindi più breve la durata della vita. In alcune specie tuttavia, questa correlazione tra tasso metabolico e la durata di vita non si manifesta. Ciò è particolarmente vero per gli uccelli e per i primati, che tendono a vivere più a lungo di quanto sarebbe prevedibile in base ai loro tassi metabolici. Un'attenta analisi della produzione di specie ossidanti ha dimostrato che ad un dato tasso metabolico, i mitocondri di queste specie tendono a produrre meno ROS. Ciò indica che è la produzione di ROS piuttosto che il tasso metabolico ad avere la maggiore correlazione con la longevità complessiva.

Sebbene inizialmente la teoria dei radicali liberi considerasse l'azione dei ROS del tutto casuale e indiscriminata, in epoca più recente si sono accumulate prove che queste agiscono anche come specifiche molecole di segnalazione, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Ad esempio, la generazione di ROS da parte dei fagociti costituisce un passaggio fondamentale nella difesa dell'ospite contro le infezioni. Analogamente, le ROS prodotte a livello citosolico in risposta a stimolazione da parte di fattori di crescita, sono coinvolte nella regolazione della risposta proliferativa cellulare.³⁴ Indipendentemente da come e dove vengano generate, i livelli di ROS possono avere due conseguenze potenzialmente importanti: provocare danni ai vari componenti cellulari e innescare l'attivazione di vie di segnalazione specifiche.

2.1 - Danno da ROS

Le ROS comprendono una varietà di specie chimiche diverse, tra cui anioni superossido, radicali idrossilici e perossido di idrogeno. Alcune di queste specie, come il radicale superossido e idrossilico, sono estremamente instabili, mentre altri, come il perossido di idrogeno, sono



Documento firmato digitalmente da Francesco-Maria Serino

liberamente diffusibili e di relativa lunga durata. Queste varie specie radicaliche possono essere esogene o prodotte all'interno delle cellule da fonti diverse. Si ritiene che la maggior parte della produzione endogena di ROS derivi dai mitocondri. La produzione di radicale superossido mitocondriale si verifica principalmente in due punti distinti della catena di trasporto degli elettroni, vale a dire al complesso I (NADH deidrogenasi) e al complesso III (ubichinone-citocromo c reduttasi). In normali condizioni metaboliche, il complesso III è il sito principale di produzione dei ROS.³⁵ Nell'invecchiamento umano, un punto critico è la formazione del radicale semichinonico ($\cdot Q^-$), che si produce come intermedio nella rigenerazione del coenzima Q. Una volta formato, il radicale semichinonico, senza catalisi enzimatica, può trasferire elettroni all'ossigeno molecolare con la conseguente generazione di un radicale superossido. La produzione di ROS diventa quindi una funzione del tasso metabolico e, come tale, il tasso di attività vitali può essere indirettamente tradotto in un corrispondente tasso di stress ossidativo. In vitro, i mitocondri convertono l'1-2% delle molecole di ossigeno consumato in anioni superossido.³⁶ Oltre a generare ossidanti, il metabolismo può produrre una serie di altri sottoprodotti, compresi il gliosale e il metilgliosale, entrambi i quali possono contribuire alla formazione di prodotti finali della glicazione avanzata (AGE - advanced glycation end-products). Qualunque sia la quantità assoluta di ROS prodotte dai mitocondri, dati i loro effetti potenzialmente dannosi, è probabile che numerosi meccanismi di protezione si siano co-evoluti per limitare la produzione e il rilascio di ossidanti. La produzione di ROS è infatti in gran parte controbilanciata da un complesso sistema di difesa antiossidante che include gli scavengers enzimatici SOD, catalasi e glutazione perossidasi. La SOD accelera la conversione di superossido a perossido di idrogeno, mentre catalasi e glutazione perossidasi convertono il perossido di idrogeno in acqua. In aggiunta a questi sistemi antiossidanti enzimatici, esistono almeno cinque membri di una famiglia relativamente nuova di scavenger di perossidi chiamati perossiredossine.^{36,37} Una varietà di sistemi non enzimatici,



costituiti da sostanze a basso peso molecolare, ha un ruolo importante nel contrastare le ROS. Questi includono l'ascorbato, il piruvato, i flavonoidi, i carotenoidi e, forse più importante, il glutathione, che è presente in concentrazioni millimolari a livello intracellulare. L'equilibrio tra la produzione di ROS e queste difese antiossidanti determina il grado di stress ossidativo.³⁸ Le conseguenze di questo stress sono legate alle modificazioni cui incorrono le proteine cellulari, i lipidi e il DNA. Tra le più studiate alterazioni indotte dallo stress ossidativo c'è quella a carico delle proteine con formazione di derivati carbonilici. La formazione del carbonile può avvenire attraverso una varietà di meccanismi compresa l'ossidazione diretta di alcune catene laterali di aminoacidi o per clivaggio peptidico indotto dall'ossidazione. Sebbene tutti gli organi e tutte le proteine possano essere alterate dallo stress ossidativo, determinati tessuti e specifiche proteine sono obiettivi privilegiati³⁹.

Diversi studi hanno dimostrato che le cellule e gli organismi sottoposti al processo dell'invecchiamento accumulano danni ossidativi al DNA nucleare⁴⁰. Forse a causa della sua vicinanza con la principale fonte di radicali liberi, o per la mancanza di un sistema efficiente di riparazione, il DNA mitocondriale è generalmente considerato ancora più sensibile al danno ossidativo rispetto al DNA nucleare. Un danno progressivo al DNA mitocondriale altera le funzioni del mitocondrio che produce ancora più ROS dando vita a un circolo vizioso che porta ad ulteriori alterazioni del DNA nucleare.

2.2 - ROS come molecole di segnale

Durante gli anni 80 e 90 del secolo scorso si sono accumulate prove che i radicali liberi e gli ossidanti svolgono un ruolo essenziale nella segnalazione cellulare e nella regolazione redox dei processi metabolici. E'ormai un dato di fatto che le modifiche post traslazionali delle proteine regolatrici si servono della chimica redox, trasducendo un segnale



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

ossidante in una risposta biologica. Complessivamente si può affermare che la segnalazione redox è coinvolta nella crescita e nella differenziazione cellulare, nell'adattamento e nella morte cellulare^{41,42}. Le evidenze attuali suggeriscono che il perossido di idrogeno e il radicale superossido siano parte dei meccanismi di trasduzione del segnale, poiché la loro produzione intracellulare può essere indotta dal legame ligando-recettore di numerosi tipi di recettori (come ad esempio i recettori delle citochine, recettore della tirosina e della chinasi serina / treonina, i recettori accoppiati a proteina G e recettori accoppiati a canale ionico), in risposta a diversi stimoli tra cui l'angiotensina II, le citochine, il glutammato, il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), il TNF- α , il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF).⁴³ Non solo le chinasi (in particolare la famiglia MAPK) e le fosfatasi possono essere modificate dagli ossidanti, ma anche enzimi metabolici, elementi del citoscheletro, fattori che controllano il ciclo e la morte cellulare più una serie di altri obiettivi redox-sensibili, compresi i fattori di trascrizione universali come NF- κ B, AP-1, CREB, Nrf2 e p53, stando a significare che i radicali liberi e gli ossidanti hanno un ruolo nella regolazione dell'espressione genica^{42,44-46}. La scoperta dell'ossido nitrico (NO•) nelle cellule dei mammiferi ha ulteriormente espanso le conoscenze sui radicali liberi come messaggeri biologici. L'ossido nitrico è un radicale gassoso ubiquitario e un messaggero intercellulare coinvolto nella regolazione dei principali organi e sistemi, tra cui il sistema immunitario, cardiovascolare e nervoso^{47,48}. Trent'anni fa circa ne venivano per la prima volta identificate le capacità vasodilatatorie. L'ossido nitrico, viene sintetizzato a partire dall'aminoacido L-arginina mediante una famiglia di ossido nitrico sintetasi (NOS), a causa del basso peso molecolare e per le proprietà idrofobiche, l'ossido nitrico permea facilmente le membrane cellulari ed è in grado di diffondere alle cellule vicine, una proprietà questa che, nel cervello, implica l'integrazione dell'attività di neuroni contigui indipendentemente dalle connessioni sinaptiche dirette fra loro⁴⁹. Il suo target è stato individuato nel gruppo eme della guanilato ciclasi

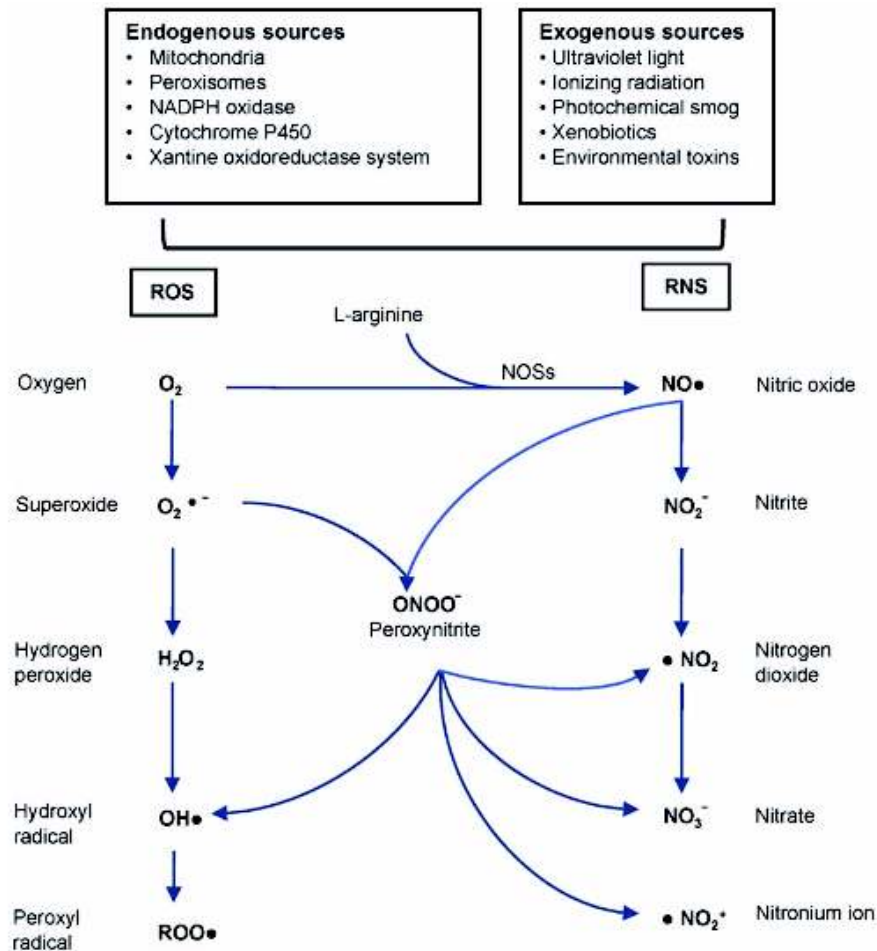


solubile (sGC), che viene attivato dall'ossido nitrico, producendo cGMP. Tuttavia, sono state individuate anche altre vie di segnalazione, indipendenti dalla produzione di cGMP, in particolare quelle con gruppi tiolici in proteine e glutazione, probabilmente coinvolgendo la catalisi dei metalli di transizione e l'interconversione fra diverse forme redox dell'ossido nitrico. Un altro elemento interessante è la competizione tra ossigeno e ossido nitrico per il centro binucleare della citocromo c ossidasi, che suggerisce un ruolo dell'ossido nitrico anche nella regolazione della respirazione mitocondriale ⁵⁰. La scoperta dell'ossido nitrico ha portato anche una nuova serie di specie reattive che si aggiungono a quelle derivate dall'ossigeno. Infatti, l'ossido nitrico è dotato di una scarsa reattività, (simile a quella dell'ossigeno) che però, sotto tensioni relativamente elevate di ossigeno, va incontro ad autossidazione formando radicali NO_2 e N_2O_3 , con proprietà nitrative e nitrosative, collettivamente chiamate RNS (reactive nitrogen species - specie reattive dell'azoto) capaci di interagire ed alterare DNA, proteine e lipidi. Inoltre, la reazione tra ossido nitrico e radicale superossido produce la potente specie ossidativa e nitrativa nota come perossinitrito, (ONOO^-) uno dei fattori coinvolti nella lipoperossidazione ⁵¹. Per tale motivo sono stati introdotti i termini stress nitrosativo e nitrossidativo. Come nel caso delle ROS anche le RNS sono un gruppo di molecole correlate, ma con proprietà biologiche e chimiche distinti. Pertanto i termini stress ossidativo e nitrosativo implicano una serie di reazioni chimiche distinte, tra cui idrossilazioni, perossidazioni, ossidazione di sulfidrilici a disolfuri, carbonilazioni, nitrosazioni, nitrosilazioni, e nitrazioni. Oltre a un coinvolgimento generale nello stress nitrosativo, si ritiene anche che le RNS agiscano da molecole di segnale in modo diverso dall'ossido nitrico ⁵².



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

Fig. 1



3 - INVECCHIAMENTO, STRESS OSSIDATIVO E MALATTIA DI ALZHEIMER

Le cellule del sistema nervoso sono influenzate dall'invecchiamento tanto quanto le cellule di altri organi, andando incontro a livelli progressivamente aumentati di stress ossidativo, nitrossidativo, omeostasi energetica alterata, accumulo di proteine danneggiate e modifiche ai danni degli acidi nucleici^{53,54}. Questi cambiamenti tipici del normale invecchiamento, sono più evidenti e severi in alcune popolazioni maggiormente vulnerabili di neuroni. Le alterazioni tipiche di ciascuna

Francesco Maria Serino

malattia neurodegenerativa (l'accumulo di β -amiloide nella malattia di Alzheimer, l' α -sinucleina nei neuroni dopaminergici nel morbo di Parkinson e Cu/Zn-SOD nei motoneuroni nella sclerosi laterale amiotrofica), si verificano, anche se in misura minore, durante l'invecchiamento fisiologico ⁵⁵. Diversi studi di genetica molecolare supportano l'esistenza sia di geni evolutivamente conservati associati ad un invecchiamento neuronale di successo (successful aging), sia di geni in grado di causare o di aumentare il rischio di una malattia neurodegenerativa ⁵⁶. Tra i geni che si ritiene abbiano un ruolo importante nel processo di invecchiamento ci sono quelli che codificano proteine coinvolte nella segnalazione del segnale insulinico, nella acetilazione e metilazione del DNA e delle proteine, nella riparazione del DNA e nel metabolismo lipidico ^{57,58}. Sviluppare una malattia degenerativa nel corso dell'invecchiamento dipende da una complicata interazione tra la genetica individuale, e quei fattori ambientali in grado di facilitare o contrastare i meccanismi molecolari e cellulari fondamentali dell'invecchiamento.

Ciascuna malattia neurodegenerativa determina alterazioni molecolari tipicamente in alcune popolazioni neuronali più vulnerabili, che sono qualitativamente simili, ma amplificate rispetto a quelle che si verificano nel sistema nervoso durante il normale invecchiamento, e che si traducono in alterazioni della funzione e infine con la loro morte.

Vi è ormai ampia evidenza che lo stress ossidativo, ha un ruolo importante nella disfunzione e nella morte delle cellule neuronali che si verificano nelle patologie neurodegenerative. Il tessuto nervoso è maggiormente suscettibile al danno ossidativo dato l'alto consumo di ossigeno, i livelli relativamente bassi di antiossidanti e la bassa capacità rigenerativa. I lipidi insaturi sono particolarmente suscettibili ad alterazioni di tipo ossidativo e i prodotti della perossidazione lipidica sono un marker consolidato di danno ossidativo. La perossidazione lipidica è il risultato dell'attacco da parte dei radicali liberi sul doppio legame degli acidi grassi insaturi, quali l'acido linoleico (LA) e acido arachidonico (ARA), per generare radicali lipidici perossidici altamente reattivi, che avviano



una reazione a catena a danno di altri acidi grassi insaturi. La reazione a catena conduce alla formazione di prodotti di decomposizione tra cui 4-idrossi 2,3-nonenale (HNE), acroleina, malondialdeide (MDA) e isoprostani.

Le cellule hanno meccanismi di difesa contro gli insulti ossidativi endogeni e le alterazioni di questi possono essere utilizzate come marker di stress ossidativo.

Le ROS sono in grado di reagire con una moltitudine di differenti molecole e di avviare la morte delle cellule neuronali, attraverso una molteplicità di percorsi diversi. L'ossidazione dei lipidi, proteine e DNA comporta funzioni cellulari deteriorate e la formazione di specie tossiche come perossidi, alcoli, aldeidi, chetoni e ossido di colesterolo. L'ossido di colesterolo è risultato tossico per linfociti e macrofagi presenti nei vasi sanguigni.⁵⁹ L'acroleina, derivato di un lipide modificato per via ossidativa, e HNE possono indurre tossicità mediante crosslinking con residui di cistina, lisina e istidina attraverso una reazione di addizione di Michael. L'acroleina è in grado di ridurre l'assorbimento di glutammato e glucosio da colture cellulari, laddove HNE modifica le proteine dando luogo ad una moltitudine di effetti, tra cui l'inibizione del trasportatore neuronale di glucosio tipo-3, del trasportatore del glutammato GLT-1, nonché della Na⁺ K⁺ ATPasi.⁶⁰⁻⁶² HNE attiva le chinasi c-Jun n-terminali e le protein-chinasi 1 mitogeno attivate (p38), stimolando la cascata apoptotica. Le alterazioni delle proteine provocano la perdita di funzionalità degli enzimi (per esempio, glutammina sintetasi, superossido dismutasi), mentre le interazioni delle ROS con il DNA può portare a mutazioni. La generazione eccessiva delle ROS porta anche a una disregolazione del segnale intracellulare del calcio, e tale alterazione è stata più volte osservata nelle malattie neurodegenerative in cui i livelli di calcio aberranti stimolano numerosi pathways che in ultima analisi inducono un cascata apoptotica.^{63,64} Le ROS sono prodotte anche attraverso vie indirette che coinvolgono l'attivazione tramite il calcio di metallo-enzimi come fosfolipasi, ossido nitrico sintasi e la xantina ossidasi. Il calcio è cruciale



nella trasduzione del segnale e come tale è sia sensibile a diversi stimoli, sia in grado di provocare una varietà di risposte cellulari differenti. Molti studi documentano la perdita dell'omeostasi del calcio nelle malattie neurodegenerative, portando ad un deterioramento in un gran numero di processi cellulari ⁶⁵ Tuttavia, la maggior parte di questi diversi percorsi di segnalazione si basano su retroazioni ed è conseguentemente difficile distinguere causa ed effetto. Un esempio di questo è l'interazione tra la segnalazione basata sul calcio e la produzione di ROS: anche se l'incremento di calcio intracellulare può indurre la produzione di ROS, a livelli non tossici è stato dimostrato che le ROS sono in grado di indurre un aumento del calcio citosolico. ^{66,67} Uno degli eventi a valle che si verificano in risposta ad un afflusso di calcio indotto da ROS, è una risposta eccitotossica cioè l'attivazione di recettori del glutammato, che innescano una cascata di eventi che portano alla morte cellulare. ^{68,69} Le risposte eccitotossiche sono considerate implicate in numerose malattie neurologiche, tra cui l'epilessia e la malattia cerebrovascolare, nonché nelle malattie neurodegenerative (non solo Alzheimer ma anche Parkinson, sclerosi laterale amiotrofica e malattia di Huntington). ⁷⁰

La maggioranza delle ROS ha origine dalla reazione dell'ossigeno molecolare con metalli redox attivi rame e ferro.⁷¹ La capacità di questi ioni metallici di occupare diversi stati di valenza e di sottoporsi ripetutamente a processi di riduzione ed ossidazione attivando così l'ossigeno molecolare, è sfruttata da molti enzimi. Tuttavia, i metalli redox-attivi privi di controllo potranno reagire impropriamente con l'ossigeno per generare ROS. E' stato proposto che le proteine implicate in diverse patologie neurodegenerative età-dipendente (A β nella malattia di Alzheimer, α -sinucleina nel morbo di Parkinson, SOD1 nella sclerosi laterale amiotrofica, la fratastina nell'atastia di Friedreich e α e β -cristallina nella cataratta), potrebbero presentare anomali siti di legame per Cu²⁺ o Fe³⁺ per reazione inappropriata con O₂. ⁷² Queste proteine potrebbero avere alcune funzioni protette da questi ioni metallici che occupano normalmente siti di legame a più alta affinità, nascosti e

schermati alle reazioni redox. Con l'aumento della concentrazione di metalli nel cervello che si accompagna con l'età, incrementa la probabilità che un sito a bassa affinità, redox attivo, possa reclutare uno ione metallico dal pool cellulare normalmente silente da un punto di vista redox. In questo modo, proteine come A β possono sfruttare biometalli endogeni per favorire l'incremento dell'attività redox e la produzione di ROS.

È noto che la produzione di ROS ha un ruolo cruciale anche nei meccanismi fisiologici che regolano il ripiegamento, il misfolding, e l'eliminazione delle proteine non ripiegate.⁷³ Il reticolo endoplasmatico (ER) svolge un fondamentale ruolo nella regolazione del ripiegamento delle proteine. In caso di abbondanza di proteine mal ripiegate, si verifica una reazione di stress del reticolo endoplasmatico, determinando così una maggiore produzione di ROS durante il processo di ripiegamento ossidativo delle proteine (formazione di legami disolfuro) e l'accumulo di proteine non ripiegate o misfolded.⁷⁴ Il conseguente impoverimento della disponibilità del glutatione e il danno mediato da ROS del sistema mitocondriale di trasferimento degli elettroni, amplifica la produzione di ROS e conduce alla morte cellulare. L'alterazione del ER è una delle caratteristiche comuni a diverse patologie neurodegenerative, per lo più caratterizzate da misfolding proteico.⁷⁵ Inoltre, uno stress ossidativo persistente altera le funzioni del sistema ubiquitina-proteasoma che è responsabile della degradazione delle proteine danneggiate.⁷⁶ Nelle piastrine e nel tessuto cerebrale post mortem di pazienti affetti da malattia di Alzheimer è stata riportata una carenza di citocromo c ossidasi. Come risultato, vi è un aumento del danno mitocondriale con incremento della produzione di ROS e danno neuronale. I mitocondri alterati generano infatti elevati livelli di ROS, esponendosi essi stessi al danno radicalico.⁷⁷



Documento firmato digitalmente da Francesco-Maria Serino

Un altro aspetto importante nella malattia di Alzheimer è l'infiammazione causata da una attivazione incontrollata delle cellule della glia.⁷⁸ Il recettore della proliferazione perossisomale γ (PPAR- γ) è un regolatore dei processi infiammatori. Lo stress ossidativo determina una fosforilazione di PPAR- γ , alterandone le proprietà funzionali.⁷⁹

Inoltre, è stato riportato che anche un lieve stress ossidativo potrebbe innescare la cascata amiloide ed essere pertanto coinvolto nelle primissime fasi della malattia di Alzheimer: infatti, ciò provocherebbe un'alterazione della compartimentazione subcellulare di BACE1 (beta site APP cleaving enzyme 1), un enzima coinvolto nel clivaggio di APP da parte della β -secretasi; di conseguenza, sarebbe favorito il processamento amiloidogenico di APP.⁸⁰ $A\beta$ è inoltre in grado di produrre ROS attraverso una reazione metallo-catalizzata.⁸¹ Le lesioni osservate nei cervelli affetti da malattia di Alzheimer sono quelle tipiche del danno da stress ossidativo (ad esempio, danno al DNA, l'ossidazione delle proteine e perossidazione lipidica) e contengono metalli in grado di esercitare l'attività catalitica necessaria alla produzione di ROS.⁸²

Ovviamente, l'esposizione allo stress ossidativo stimola l'attivazione di risposte compensatorie antiossidanti sia di tipo enzimatico sia non enzimatico. Tuttavia questi sistemi sembrano essere compromessi nei pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer, sebbene i dati in letteratura siano a tal riguardo controversi.⁸³⁻⁸⁵ Nel cervello di pazienti con Alzheimer, l'attività delle proteine antiossidanti catalasi, superossido dismutasi (SOD), glutazione perossidasi (GPx) e glutazione reduttasi (GR) sono aumentate a livello dell'ippocampo e dell'amigdala.⁶⁰ E' plausibile che la SOD possa essere indotta dallo stress ossidativo nelle prime fasi della malattia di Alzheimer e vada quindi incontro a consumo ed esaurimento nella fase avanzata (c.d. challenging ossidativo). GPx e GR sembrano essere, rispettivamente superiore ed inferiore nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer, rispetto ai controlli. Quindi, il rapporto di attività GR/GPx risulta essere più elevato nei soggetti sani, intermedio nei soggetti affetti da declino cognitivo lieve (MCI- mild cognitive

impairment), e più basso nei pazienti con malattia di Alzheimer conclamata. Inoltre, è stato osservato che tale rapporto è risultato essere positivamente correlato con i punteggi al Mini Mental State Examination (MMSE).⁸⁶ Coerentemente, la riduzione di GR (che rigenera il glutatione ridotto da glutatione ossidato - GSSG-), si associa a livelli di GSSG più elevati in pazienti affetti da malattia di Alzheimer e correla con lo stadio della malattia.

Esiste una notevole mole di osservazioni che mostra come l'omeostasi di ferro, zinco e rame e le loro rispettive proteine leganti, siano significativamente alterate nel cervello di pazienti affetti da malattia di Alzheimer. E' stato proposto che la maggiore fonte di stress ossidativo per eccessiva produzione di radicali liberi a livello cerebrale, nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer, siano proprio i metalli di transizione rame e ferro quando legati alla A β .⁸⁷

Recenti risultati hanno evidenziato l'importanza di Zn²⁺ nella formazione della placca amiloide.⁸⁸ Nelle placche presenti in tessuto cerebrale di pazienti affetti da malattia di Alzheimer, sono state ritrovate elevate concentrazioni di rame (400 μ M), zinco (1 mM) e ferro (1 mM)⁸⁹. Studi in vitro hanno dimostrato che bassi livelli μ M di Zn²⁺ possono indurre aggregazione e precipitazione resistente alle proteasi di A β .⁹⁰ Anche Cu²⁺ e Fe³⁺ possono indurre l'aggregazione del peptide, che aumenta a pH acido.⁹¹ Questi metalli sono normalmente presenti ad alte concentrazioni nelle regioni cerebrali più sensibili alla neurodegenerazione. Durante la neurotrasmissione vengono rilasciate alte concentrazioni di zinco (300 μ M) e rame (30 μ M), e ciò potrebbe spiegare il motivo per cui le precipitazioni di A β avvengono a livello sinaptico.⁹²

Una analisi della corteccia e dei nuclei accessori basali dell'amigdala, utilizzando emissione di raggi X indotta da microparticelle, ha mostrato che questi metalli si accumulano nel neuropilo di pazienti affetti da malattia di Alzheimer, in concentrazioni che sono da tre a cinque volte superiori rispetto ai controlli di pari età.^{87,93} Le concentrazioni di rame in soggetti affetti da malattia di Alzheimer sono aumentate di 2,2 volte nel



liquor cefalorachidiano e maggiormente elevate anche nel plasma.^{94,95}
E'nota anche la presenza del ferro all'interno dei depositi di amiloide del cervello umano.⁸⁹

4 - ACIDI GRASSI POLINSATURATI E CERVELLO

Il cervello è ricco di fosfolipidi, che sono fondamentali per i processi di neurotrasmissione, nella plasticità sinaptica e in ultima analisi nei processi cognitivi. I fosfolipidi cerebrali contengono un'alta percentuale di acidi grassi polinsaturi (PUFA), specialmente acido docosaesaenoico (DHA) e acido arachidonico (AA).

E' stato osservato come all'aumentare dell'attività radicalica, il contenuto di PUFA nel cervello vada incontro a graduale declino.⁹⁶ Inoltre, gli idroperossidi lipidici sono particolarmente instabili e possono andare incontro ad una spontanea decomposizione in vari prodotti, tra cui MDA, 4-HNE, chetoni ed epossidi.

I prostanoidei derivano dall'acido arachidonico e sono sintetizzati dalla cicloossigenasi 1 (COX-1) e dalla cicloossigenasi 2 (COX-2) inducibile, entrambe le quali sono espresse dalle cellule della glia. In un modello murino di malattia di Alzheimer, inibendo la COX-1 si ha un effetto soppressivo sulla deposizione di amiloide.⁹⁷ Inoltre è stato osservato che le concentrazioni della prostaglandina pro-infiammatoria PGE2 sono elevate in pazienti affetti da malattia di Alzheimer.⁹⁸ La neuroprotectina D1 (nota anche come 10R, 17S-DHA) è un derivato dell'acido docosaesaenoico (DHA) e agisce come mediatore autocrino / paracrino. I suoi effetti si riscontrano durante le prime fasi della risposta neuroinfiammatoria. Tra questi sono stati descritti la riduzione del clivaggio amiloidogenico di APP, il blocco dell'espressione di geni pro-infiammatori e la promozione della sopravvivenza delle cellule



neuronal. Inoltre, il processamento anti-amiloidogeno dovuto alla neuroprotectina D1 ha come target l'attivazione dell'alfa secretasi, della beta secretasi e del recettore PPAR γ .

Nel cervello, gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) regolano sia la struttura sia la funzione dei neuroni, delle cellule gliali e di quelle endoteliali. Negli ultimi dieci anni, ci sono stati importanti progressi nella nostra comprensione del metabolismo fisiologico e patologico dei PUFA a livello cerebrale. I meccanismi attraverso cui i PUFA possono accedere al cervello e come vengono processati al suo interno, sono stati identificati e caratterizzati, così come è stata identificata una serie di nuove molecole di segnalazione derivate dagli acidi grassi polinsaturi. Inoltre, gli studi hanno dimostrato un ruolo cruciale dei PUFA nel determinare la sopravvivenza neuronale, la neurogenesi, la funzione sinaptica e nel regolare i livelli di infiammazione cerebrale. Non stupisce quindi che una assunzione alimentare squilibrata di PUFA e l'alterazione del metabolismo degli stessi, siano stati segnalati in una serie di disturbi neurologici e psichiatrici.^{99,100}

Gli acidi grassi saturi e monoinsaturi (MUFAs) possono essere sintetizzati de novo all'interno cervello, ma i PUFA sono principalmente derivati dal sangue. L'acido linoleico (LA) e l'acido α -linolenico (ALA) sono acidi grassi essenziali, ricavati attraverso la dieta e sono precursori dell'arachidonico (AA) e dell'acido docosaesaenoico (DHA), PUFA anch'essi. Il cervello esprime gli enzimi che sono necessari per la sintesi di DHA e AA. Tuttavia è stato osservato che nei roditori il tasso di sintesi di questi PUFA nel cervello è molto inferiore al tasso di PUFA assorbiti dal plasma. Inoltre, i livelli cerebrali di enzimi coinvolti nella sintesi di AA e DHA sembrano fissi (invece il fegato, è in grado di regolare l'espressione di questi enzimi in risposta all'apporto alimentare). Queste osservazioni portano a ritenere che il cervello richieda un costante rifornimento di AA e DHA dal sangue. Le stime attuali di assorbimento dal pool plasmatico di AA e DHA non esterificati da parte del cervello sono di circa 18 e 4 mg al giorno, rispettivamente e la loro emivita nel cervello è stimata pari a 147 e 773

giorni rispettivamente.¹⁰¹ Se si rende disponibile un pool plasmatico diverso da quello degli acidi grassi non esterificati, l'uptake di AA e DHA nel cervello può essere più elevato, il loro turnover più rapido e loro emivita più breve. Una volta entrati nel cervello, la maggior parte dei PUFA - soprattutto DHA e AA - sono attivati da una Acil-CoA sintetasi per acidi grassi a catena lunga (ACSL - long-chain-fatty-acid-CoA synthase) e poi esterificati nei fosfolipidi di membrana. Altri PUFA, come ALA e EPA, vanno incontro a β -ossidazione. L'esterificazione degli acil-CoA a lisofosfolipidi probabilmente è mediato dalla famiglia di enzimi cui appartengono 1-acilglicerol-3-fosfato-O-aciltransferasi (AGPAT) e la acil transferasi dell'acido lisofosfatidico (LPAAT). I membri della famiglia di transporter di acidi grassi contenenti ACSL e AGPAT e LPAAT sembrano avere una modesta selettività nei confronti dei diversi acidi grassi, ma se agissero in sequenza con altre proteine, questo potrebbe spiegare la distribuzione altamente specifica degli acidi grassi nel cervello. Lievi differenze di selettività potrebbero indirizzare gli acidi grassi verso l'esterificazione in determinati lisofosfolipidi, verso la β -ossidazione o verso altri percorsi metabolici all'interno del cervello. A livello cerebrale la quantità di ATP generata dalla β -ossidazione degli acidi grassi è molto inferiore a quella generata per ossidazione del glucosio (con eccezione delle zone periventricolari). E' stato recentemente ipotizzato che il livello relativamente basso di β -ossidazione degli acidi grassi nel cervello sia dovuto in parte all'eccesso di stress ossidativo (e conseguente danno cellulare) generato nel corso di questo processo.¹⁰²¹⁰³. Coerentemente con questa teoria, l'inibizione farmacologica della β -ossidazione nel cervello diminuisce i livelli di metaboliti derivanti da auto-ossidazione dei PUFA cerebrali.¹⁰⁴ Dopo essere esterificati nei fosfolipidi di membrana, gli acidi grassi possono essere idrolizzati dalla fosfolipasi A1 (PLA1) e dalla fosfolipasi A2 (PLA2). Ci sono prove che i processi di rilascio degli acidi grassi dalla membrana siano regolati in maniera selettiva.¹⁰⁵ Dopo il rilascio dalla membrana plasmatica, oltre il 90% dell' AA e del DHA sono immediatamente riesterificati nei fosfolipidi tramite il ciclo di Lands. La



ACSL utilizza due fosfati ad alta energia dall'ATP e, basandosi sull'elevato tasso di rilascio degli grassi da parte della PLA2 e di riesterificazione nella membrana (circa il 100% al giorno in roditori), è stato calcolato che questo processo può consumare fino al 5% dell'ATP cerebrale. L'importanza di un percorso così dispendioso in termini energetici non è tuttavia noto, sebbene sia lecito ipotizzare che serva a conservare, almeno in parte, stabili livelli di PUFA a livello cerebrale.¹⁰⁶. Il consumo e il rimpiazzo di PUFA nel cervello può essere visualizzata in vivo negli esseri umani tramite tomografia ad emissione di positroni (PET). L'attivazione di recettori accoppiati a PLA2 determina la conversione dei PUFA in derivati bioattivi (che sono spesso indicati come "mediatori"). I principali enzimi coinvolti nella sintesi di mediatori derivanti da PUFA sono la ciclossigenasi (COX), la lipossigenasi (LOX) ed il citocromo P450. A differenza di molti altri tessuti, la COX2 basale è espressa in maniera significativamente più elevata nei neuroni e facilita la conversione di AA in PGE2, una potente molecola di segnalazione nel cervello.¹⁰⁷. Al contrario di AA, del quale sono stati individuati e descritti numerosi mediatori derivati, si conoscono e sono stati descritti nel tessuto cerebrale ancora pochi mediatori derivanti da DHA: 17S-idrossi-DHA, neuroprotectina D1, resolvina D5, 14-HDHA e maresina 1. Le cellule cerebrali coinvolte nella sintesi dei mediatori derivati da PUFA non sono completamente note. Si sa ad esempio che le cellule gliali producono la neuroprotectina D1. Inoltre molti derivati lipidici vengono espressi solo dopo danno cerebrale, ischemia o infiammazione.

Uno dei target principali del processo di perossidazione lipidica è il sistema nervoso centrale (CNS). Infatti, il cervello è molto sensibile allo stress ossidativo, poichè consuma circa il 20-30% dell'ossigeno inspirato, contiene alti livelli di acidi grassi polinsaturi (PUFA), ed è quindi un bersaglio ideale per l'attacco da parte dei radicali liberi. I metalli redox attivi, ampiamente presenti a livello cerebrale, giocano un ruolo cruciale nell'avviare e propagare la cascata di reazioni che inizia con l'estrazione di un elettrone dal sistema di doppio legame coniugato dalla catena acilica



Documento firmato digitalmente da Francesco-Maria Serino

degli acidi grassi. Questo processo porta alla formazione di una varietà di specie di radicali liberi, in grado di reagire facilmente con proteine, acidi nucleici e altri lipidi. Questi eventi sono ulteriormente aggravati nel cervello dalla relativa incapacità delle cellule neuronali nel neutralizzare i radicali liberi causa della scarsità di sistemi antiossidanti enzimatici e non. La perossidazione lipidica è una delle principali fonti di danno mediato da radicali a carico delle membrane neuronali, e dà vita a una serie di prodotti secondari responsabili di vasti danni cellulari. L'attacco dei radicali liberi ai PUFA porta alla formazione di aldeidi elettrofile altamente reattive.¹⁰⁸ Oltre alla formazione di aldeidi, radicali lipidici idroperossilici subiscono endociclicizzazione per la produzione di esteri degli acidi grassi; due classi di questi acidi grassi ciclizzati sono gli isoprostani e i neuroprostani. La perossidazione dell'AA porta alla formazione di F2-isoprostani (F2-IsoPs), mentre F2 e F4-neuroprostani (F2 e F4-NP) sono il prodotto stabile di danno radicalico ai danni del DHA. Una volta formati, F2-NP e F4-NP possono subire idrolisi a iso- e neuroprostani liberi e possono essere misurati nei fluidi corporei, e F2-NP e F4-NP possono subire ulteriore conversione non enzimatica a sostanze direttamente dannose per le cellule.¹⁰⁹ La MDA risulta principalmente dalla degradazione ossidativa dei PUFA con la rottura di almeno due doppi legami. Nei tessuti dei mammiferi, i precursori della MDA saranno pertanto principalmente AA (20:4) e DHA (22:6). Dei possibili meccanismi per la formazione di MDA da questi PUFA furono proposti da Pryor e Stanley¹¹⁰ implicando la formazione di endoperossidi biciclici come intermedi, che successivamente si scindono per liberare MDA mediante reazioni termiche o acido-catalizzate. Numerosi altri meccanismi sono stati individuati^{111,112}. MDA è tipicamente dosata su campioni di plasma tramite un saggio colorimetrico basato sulla reazione tra MDA e acido tiobarbiturico (TBA). Tuttavia, anche se adatto ad elevati volumi di analisi, questo saggio per le sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) manca di specificità per la MDA, reagendo anche con aldeidi diverse da



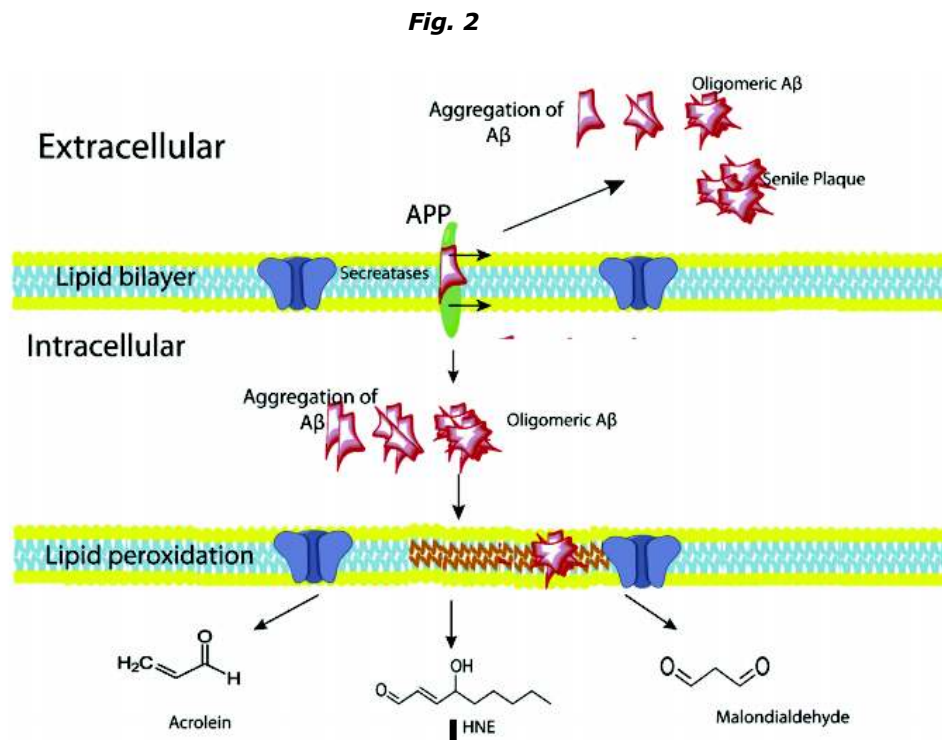
MDA dando vita a composti che assorbono nella stessa gamma di MDA.

¹¹³.

Le cellule sono anche dotate di antiossidanti lipidici, soprattutto vitamine liposolubili e glutazione, glutatione s-transferasi, una isoforma della glutatione perossidasi, e beta-alanil-L-istidina, che può inattivare ossidanti lipidici tra cui HNE. Inoltre, l'albumina e le apolipoproteine nel plasma possono legarsi e tamponare HNE. Tuttavia, uno specifico processo di riparazione della perossidazione lipidica non esiste come avviene per le proteine e il DNA e questo può spiegare il motivo per cui livelli moderati di perossidazione lipidica potrebbero avere un significato fisiologico di segnalazione cellulare e un ruolo nel rimodellamento di membrana. ¹¹⁴ La perossidazione dei lipidi di membrana colpisce una varietà di funzioni con conseguente aumento della rigidità della membrana, diminuita attività di enzimi legati ad essa (ad esempio, della pompa del sodio), deterioramento dei recettori di membrana e alterazione della permeabilità. ^{115,116} In aggiunta ai danni ai fosfolipidi, i radicali liberi sono anche in grado di attaccare direttamente le proteine di membrana e indurre cross-linking tra lipidi e proteine, o tra proteine tra loro, che contribuiscono ad alterare l'integrità della membrana. ¹¹⁷ È ragionevole ipotizzare che la perturbazione di tutte le suddette funzioni mostrate dai PUFA e dai loro metaboliti, insieme con la modificazione delle proteine, alteri l'omeostasi neuronale, contribuendo alla neurodegenerazione. Nella malattia di Alzheimer, oligomeri di A β possono inserirsi nel doppio strato lipidico e dare avvio al processo di perossidazione con la formazione di MDA, HNE, e acroleina.



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino



5 - REVISIONE DELLA LETTERATURA SU LIPOPEROSSIDAZIONE E MALATTIA DI ALZHEIMER

Il ruolo del danno ossidativo nella patogenesi della malattia di Alzheimer è stato suggerito da una mole considerevole di studi *in vivo* e *post mortem*. Il razionale dei lavori procede dall'ipotesi che lo stress ossidativo sia un fenomeno che inizia precocemente ed evolve con la progressione della malattia di Alzheimer. Tale ipotesi è stata sondata, negli anni, in diversi tipi di studi.

Nell'ambito degli studi di valutazione dello stress ossidativo centrale nella malattia di Alzheimer o nel MCI, possiamo individuarne alcuni di particolare rilievo. Uno studio *post mortem* effettuato su 4 soggetti affetti da MCI e 4 controlli, ha riscontrato in alcune aree cerebrali la presenza di livelli aumentati di HNE, rispetto alle stesse aree nei soggetti di controllo ¹¹⁸. Uno studio simile, effettuato *post mortem* su 6 soggetti con MCI e 6 controlli, ha riscontrato, nei soggetti con MCI, l'aumento di ossidazione proteica in alcune aree cerebrali ¹¹⁹. Uno studio precedente, basato su analisi *post mortem* di soggetti affetti da malattia di Alzheimer, soggetti affetti da sclerosi laterale amiotrofica e controlli, ha individuato un incremento di F2-isoprostani nel CSF dei soggetti con malattia di Alzheimer rispetto ai controlli, ma non nei soggetti affetti da SLA ¹²⁰. In uno studio *post mortem* del 2009, effettuato su 4 soggetti affetti da EAD (Early Alzheimer's Disease) e 4 controlli, è stato individuato un incremento di markers di lipoperossidazione (HNE) in alcune aree cerebrali dei soggetti affetti, rispetto ai controlli ¹²¹. Non sono, invece, state riscontrate differenze significative in uno studio *post mortem* su 9 soggetti con sindrome di Down, 10 soggetti con malattia di Alzheimer e 14 controlli, dei quali lo studio ha valutato attività di SOD1, GPx, livelli di MDA e o-tirosina ¹²². In uno studio *post mortem* su 13 soggetti affetti da malattia di Alzheimer e 13 controlli, non è stata riscontrata alcuna differenza per quanto concerne gli indici di ossidazione lipidica. Risultava una differenza significativa per i markers di danno ossidativo alle proteine solo in una delle 7 regioni cerebrali valutate. Veniva altresì individuato un incremento di alcune basi ossidate (danno al DNA sia nucleare che mitocondriale) solo in alcune aree ¹²³. Due diversi studi, del 2000 e del 2007, hanno rilevato un aumento di TBARs, MDA (individualmente valutata), GSH (glutazione ridotto) in soggetti affetti da malattia di Alzheimer portatori di APOE4 ¹²⁴ ¹²⁵. Altre osservazioni interessanti individuano, in pazienti affetti da malattia di Alzheimer, un aumento di HNE libero e addotti HNE-proteine ¹²⁶⁻¹²⁸, un incremento di TBARS ¹²⁹, un aumento della perossidazione e una riduzione dell'attività enzimatica



antiossidante ¹³⁰, un incremento della ossidazione proteica e la disfunzione dell'attività enzimatica antiossidante, anche in soggetti anziani sani ¹³¹, un'aumentata vulnerabilità allo stress ossidativo in alcune aree cerebrali ¹³² e l'ossidazione di proteine e lipidi nel cervello di pazienti con malattia di Alzheimer ¹³³.

Un altro approccio è stato utilizzato negli studi di suscettibilità allo stress ossidativo in associazione all'invecchiamento. Uno studio del 1997, ad esempio, ha effettuato un confronto tra eritrociti di soggetti giovani sani e soggetti anziani sani. È stata indotta l'ossidazione tramite idroperossido di cumene (CumOOH), per poi valutare i livelli di MDA e dell'attività della Ca²⁺-ATPasi negli eritrociti (senza indurre emolisi). Dallo studio emerge che, sebbene in condizioni basali i livelli di stress ossidativo di anziani e giovani siano comparabili, le membrane eritrocitarie dei soggetti anziani risultano più vulnerabili allo stress ossidativo ¹³⁴. Altri studi, invece, evidenziano livelli elevati di MDA in funzione dell'età già in condizioni basali, su modelli animali ¹³⁵ e su un campione umano ¹³⁶. Altri studi effettuati su linfociti isolati da soggetti giovani e soggetti anziani sani osservano l'incremento di markers di danno ossidativo (alle proteine in particolare) in soggetti anziani rispetto ai giovani, sebbene non trovino differenze nei livelli di enzimi antiossidanti ¹³⁷.

Un altro filone è rappresentato dagli studi di suscettibilità allo stress ossidativo in pazienti affetti da Alzheimer. Analizzando 35 pazienti affetti da malattia di Alzheimer, confrontati con 40 controlli sani omologhi per età e sesso, sono stati riscontrati, nei soggetti malati, ridotti livelli di antiossidanti plasmatici e aumentati livelli di MDA. Dopo un'esposizione a radicale perossilico, il plasma ha mostrato una velocità di produzione di MDA più alta nei soggetti affetti da malattia di Alzheimer rispetto ai soggetti sani ¹³⁸. Un altro studio, effettuato su 52 pazienti affetti da malattia di Alzheimer, 42 controlli sani e 16 pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica, inducendo stress ossidativo nel plasma tramite solfato di rame ha poi misurato i prodotti di lipoperossidazione tramite TBARs. Nessuna differenza basale emergeva tra i gruppi, ma i livelli di

TBARs risultavano più elevati nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer, sia rispetto ai controlli che ai pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica. Si notava inoltre una strana correlazione inversa tra livelli di lipoperossidazione riscontrati ed estrinsecazione clinica della malattia, con una significativa correlazione inversa tra livelli di perossidazione e grado della malattia¹³⁹. In un confronto tra soggetti sani giovani, soggetti sani anziani e pazienti affetti da malattia di Alzheimer, effettuato tramite misurazione nei linfociti dei livelli intracellulari basali di ROS, basali e dopo stimolazione con d-ribosio e staurosporina, sono stati individuati livelli basali di ROS maggiori nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer, bassa suscettibilità alla produzione di ROS indotta da d-ribosio e aumentata risposta alla staurosporina rispetto ai controlli anziani sani.¹⁴⁰ Uno studio autoptico su porzioni cerebrali di pazienti affetti da malattia di Alzheimer e controlli omologhi per età e sesso ha individuato livelli basali di MDA uguali tra pazienti e controlli, ma, dopo stimolazione con FeSO₄ e H₂O₂, la produzione di MDA è risultata superiore nei campioni provenienti da soggetti affetti da malattia di Alzheimer¹⁴¹.

Un ulteriore approccio è stato utilizzato negli studi di confronto tra stress ossidativo periferico in malattia di Alzheimer e MCI. In uno studio del 2008 è stata valutata un'ampia varietà di antiossidanti enzimatici e non, specie ossidative dell'azoto, markers di ossidazione lipidica (misurati mediante la formazione di addotto TBA-MDA) e proteica. Su una popolazione di 85 soggetti affetti da MCI, 42 affetti da malattia di Alzheimer lieve e 37 controlli omologhi per età, è stato individuato negli eritrociti (ma non nel plasma), un incremento significativo di perossidazione lipidica sia nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer sia in quelli affetti da MCI rispetto ai controlli. La presenza di ApoE4 si associava, negli eritrociti, a maggiore perossidazione lipidica¹⁴².

Fig. 3



	Controls (n = 37)	MCI (n = 85)	mild AD (n = 42)
Uric acid vs. TAS – plasma	0.584***	0.587***	0.578***
Vitamin A vs. Vitamin E – plasma	0.352*	0.282**	0.360*
MDA – plasma vs. MDA – erythrocytes	0.344*	0.356**	0.367*
GPx vs. GSSG – erythrocytes	0.388*	0.237*	0.371*
MDA vs. GSH – erythrocytes	– 0.404*	– 0.423**	n.s.
MDA vs. Vitamin E – erythrocytes	– n.s.	n.s.	– 0.464**

Fig. 3 - Correlazioni significative tra antiossidanti e marker ossidativi in soggetti con MCI, malattia di Alzheimer e controlli

Uno studio del 2011 ipotizza che esista uno squilibrio tra fattori pro-ossidanti e difese antiossidanti in soggetti affetti da MCI e Alzheimer, che varia con la progressione della malattia ¹⁴³. A tal fine è stata valutata la perossidazione lipidica tramite dosaggio di MDA nel plasma. Sono state quindi misurate l'attività di catalasi, glutazione perossidasi, glutazione reductasi e glutazione S-transferasi per valutare la relazione tra stress ossidativo e performance cognitiva. Lo studio ha coinvolto una popolazione di 29 pazienti di età compresa tra 66 e 90 anni con diagnosi probabile di Alzheimer e demenza moderata (MMSE tra 18 e 26) e 33 pazienti di età compresa tra 61 e 89 anni affetti da MCI. I livelli di MDA nel plasma sono risultati più alti nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer, sia rispetto ai soggetti con MCI, sia rispetto ai controlli.



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

Fig. 4

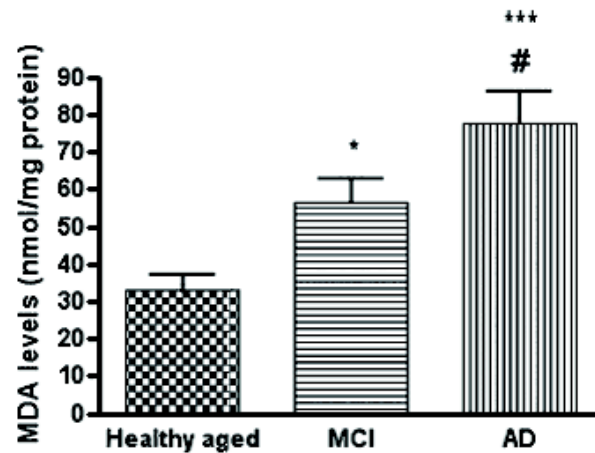


Fig. 4 - Livelli di MDA nel plasma di controlli anziani sani, MCI e malattia di Alzheimer. I dati sono espressi come media \pm SEM.

Un ulteriore studio ¹⁴⁴ si è basato sulla valutazione dei livelli di MDA (valutati negli eritrociti), SOD, CAT, GPx, GR in pazienti affetti da malattia di Alzheimer e demenza vascolare. La popolazione presa in esame era composta di 150 soggetti (50 affetti da malattia di Alzheimer, 50 da VD e 50 controlli non dementi) di età compresa tra 65 e 80 anni. I risultati mostrano una differenza significativa nei livelli di MDA tra soggetti affetti da malattia di Alzheimer, soggetti affetti da VD e soggetti sani.

Fig. 5

	Control group		Vvascular dementia		Alzheimer dementia	
	No	X \pm SD	No	X \pm SD	No	X \pm SD
Total	50	536.62 \pm 71.12	50	712.15 \pm 74.09	50	897.34 \pm 81.22
Females	27	533.81 \pm 76.45 ^{a,b}	28	709 \pm 75.93 ^a	26	846.83 \pm 77.65 ^b
Males	23	531.41 \pm 78.51 ^{c,d}	22	715.42 \pm 84.61 ^c	24	843.58 \pm 76.48 ^d
65-74 years	24	442.39 \pm 86.74 ^{e,f}	24	649.51 \pm 79.83 ^e	22	728.79 \pm 68.54 ^f
75-84 years	21	571.83 \pm 89.78 ^{g,h}	22	715.85 \pm 86.21 ^g	23	905.23 \pm 71.52 ^h
>85 years	5	651.53 \pm 87.96 ⁱ	4	803.69 \pm 74.37	5	1.059.34 \pm 95.72 ⁱ

Fig. 5 - Livelli di MDA in controlli, pazienti con VD e pazienti con malattia di Alzheimer.

Un altro studio ha preso in esame gli antiossidanti periferici in pazienti affetti da morbo di Parkinson, malattia di Alzheimer e demenza vascolare, mediante dosaggio di TBARs da eritrociti ¹⁴⁵. La popolazione oggetto di

indagine comprendeva 75 soggetti affetti da malattia di Alzheimer, demenza vascolare, morbo di Parkinson e controlli. In uno studio del 2010¹⁴⁶ sono stati trovati livelli di MDA più elevati in pazienti affetti da Alzheimer e MCI. Sono stati valutati, a questo scopo, enzimi antiossidanti ed MDA (tramite saggio dell'acido tiobarbiturico) nel siero. Il campione, in questo caso, era composto da 45 soggetti (15 affetti da MCI, 15 affetti da malattia di Alzheimer, 15 controlli sani di età simile).

Fig. 6

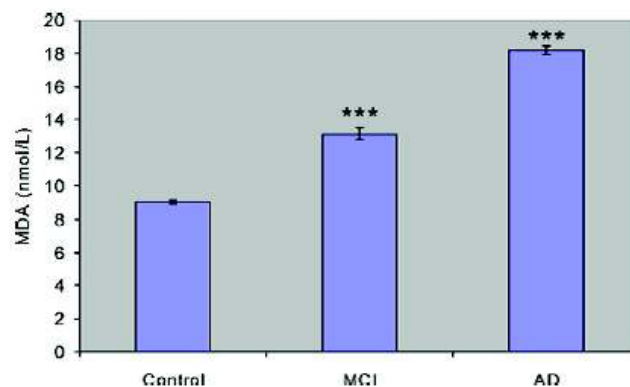


Fig. 6 - Livelli di MDA in controlli, MCI e malattia di Alzheimer. I dati sono espressi come media \pm SEM.

La produzione di TBARs negli eritrociti era significativamente più elevata in soggetti affetti da malattia di Alzheimer, sia rispetto ai controlli di età equivalente, sia rispetto ai controlli di età più giovane, come risulta da uno studio del 2005. La valutazione di TBARs, SOD, NOS in eritrociti e piastrine è stata effettuata su una popolazione di 53 pazienti affetti da malattia di Alzheimer, 40 controlli omologhi per età e 37 controlli sani¹⁴⁷.

Fig. 7

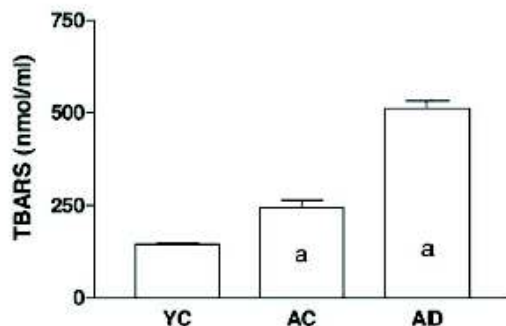
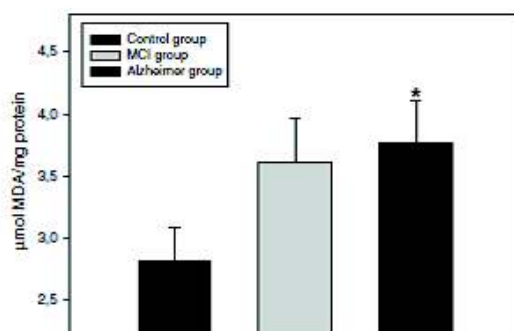


Fig. 7 Produzione di TBARS negli eritrociti in controlli giovani (YC), controlli anziani (AC) e malattia di Alzheimer. I dati sono espressi come media \pm SEM

Risultati simili sono stati ottenuti da un altro studio, che ha confrontato l'attività metalloproteinasica con i livelli di stress ossidativo, in considerazione del fatto che i radicali liberi hanno una funzione di controllo sull'attività proteasica¹⁴⁸. Sono stati valutati enzimi antiossidanti e MDA nel plasma in una popolazione composta da 34 pazienti affetti da MCI, 45 pazienti affetti da malattia di Alzheimer, 28 controlli sani omologhi per età. Va sottolineato che gli autori riferiscono l'assenza di differenze significative tra MDA in pazienti con MCI e controlli.

Fig. 8



*Fig. 8 - Livelli di MDA nel plasma in controlli, MCI, e soggetti con malattia di Alzheimer. *Differenza significativa rispetto a controlli anziani sani*

Uno studio del 2006, su una popolazione di 36 pazienti con MCI, 71 affetti da malattia di Alzheimer, e 28 affetti da demenza vascolare, ha valutato ROS sierici (tramite dROMs), omocisteina e capacità antiossidante totale (TAC) in pazienti affetti da malattia di Alzheimer, confrontandoli con controlli sani omologhi per età ¹⁴⁹.

Fig. 9

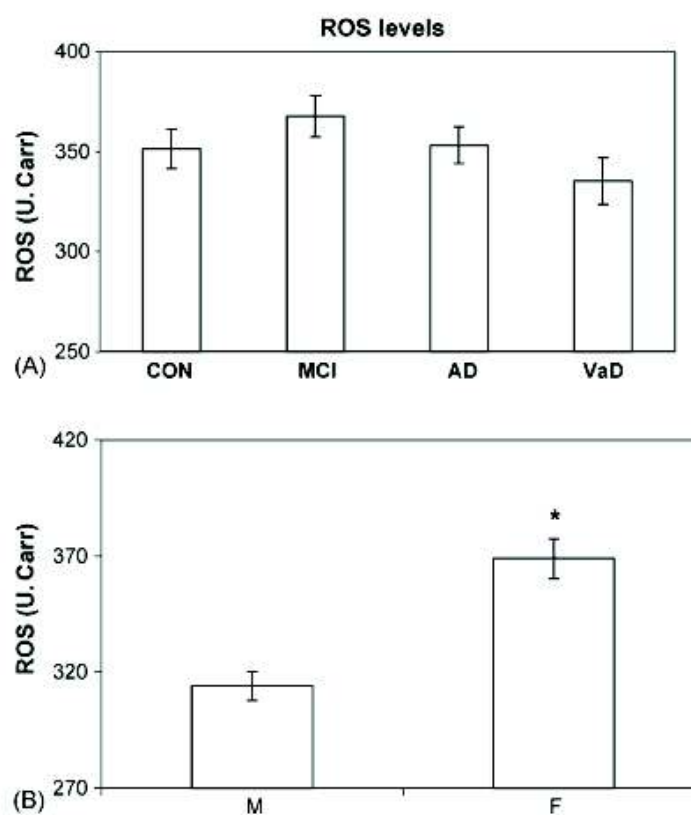


Fig. 9 - Valori medi \pm SEM di ROS in: (A) MCI (n=36), malattia di Alzheimer (n=71) e VaD (n=28) confrontati con controlli (n=44).

In un altro studio condotto su 20 pazienti con malattia di Alzheimer e 23 controlli anziani sani, il focus è stato messo sul dosaggio di alfa-tocoferolo, retinolo, MDA (in plasma ed eritrociti), attività antiossidante enzimatica eritrocitaria (glutazione perossidasi e Cu-Zn superossido dismutasi). La popolazione campione è stata di 20 pazienti affetti da malattia di Alzheimer e 23 controlli anziani sani ¹⁵⁰.

Fig. 10

	Mean level (\pm SD), by group	
	Patients	Controls
α -Tocopherol		
Plasma, mg/l	15.1 \pm 3.5 ^a	18.2 \pm 3.6
Erythrocyte, nmol/gHb	19.1 \pm 11.2	28.0 \pm 15.9
Retinol		
Plasma, mg/l	0.54 \pm 0.19 ^b	0.71 \pm 0.24
Erythrocyte, nmol/gHb	1.26 \pm 0.54	1.06 \pm 0.48
Plasma MDA, μ mol/l		
Free	0.69 \pm 0.19 ^c	0.57 \pm 0.13
Total	1.15 \pm 0.56	1.06 \pm 0.33
Erythrocyte MDA, nmol/gHb		
Free	9.8 \pm 4	9.8 \pm 4.50
Total	14.0 \pm 5.0	17.0 \pm 5.8
Erythrocyte activity, U/gHb		
Glutathione peroxidase	32 \pm 10	33 \pm 10
Superoxide dismutase	850 \pm 220	763 \pm 200

Fig. 10 - Livelli di antiossidanti eritrocitari e plasmatici e attività antiossidante enzimatica eritrocitaria in pazienti affetti da malattia di Alzheimer e controlli.

l'attività enzimatica, la concentrazione di vitamine e i livelli di MDA eritrocitari sono risultati analoghi nei due gruppi. Un altro lavoro, analogo a questo, ha avuto risultati non significativi ¹⁵¹.

Ci sono, poi, altri lavori sullo stress ossidativo periferico/centrale in malattia di Alzheimer e/o MCI, tra cui uno studio con 8,12-iso-iPF₂₀ dosati nelle urine, nel sangue e nel CSF in pazienti con malattia di Alzheimer, che correlano con le misure di rallentamento cognitivo e funzionale, con i markers di patologia di Alzheimer dosati nel CSF (proteina tau e amiloide) e aplotipo APOE ¹⁵². In uno studio successivo, è stata effettuata la misurazione di 8,12-iso-iPF₂₀-VI in urina, plasma e CSF di pazienti con



malattia di Alzheimer, MCI e soggetti anziani cognitivamente integri ¹⁵³. Sono stati riscontrati livelli aumentati in tutti i tessuti analizzati nei soggetti con malattia di Alzheimer rispetto a quelli con MCI, e di questi ultimi rispetto ai controlli. Avendo riscontrato una diretta correlazione tra livelli di 8,12-iso- iPF2 α -VI nel CSF e nel plasma (e nelle urine), gli autori affermano che questo possa essere un valido marker precoce di ossidazione centrale e possa, quindi, trovare posto, insieme alla misurazione volumetrica dell'ippocampo e al genotipo apoE, nella diagnosi precoce di malattia di Alzheimer. Va notato che gli isoprostani nel CSF non correlano bene con la gravità della demenza, ma sono aumentati significativamente nelle fasi iniziali ¹⁵⁴. Vanno, inoltre, citati, alcuni studi che non hanno rilevato differenze significative nei livelli di MDA su plasma ed eritrociti nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer, rispetto ai controlli ^{142,155-157}. Sono, inoltre, presenti studi che non trovano differenze nel dosaggio di isoprostanoidi periferici nella malattia di Alzheimer ^{158,159}. Altri studi si sono concentrati sull'osservazione delle differenze in termini di MDA e proteine carbonilate ¹⁶⁰, oppure sul danno ossidativo su DNA in leucociti periferici ¹⁶¹.

Ci sono poi diversi studi di confronto tra stress ossidativo centrale in malattia di Alzheimer e MCI. Uno studio longitudinale su pazienti affetti da MCI e malattia di Alzheimer, studiati prima e dopo il decesso, ha osservato un incremento di F2-IsoP in alcune aree cerebrali nei soggetti affetti da MCI e malattia di Alzheimer ma non nei controlli. Nessuna differenza sensibile è stata rilevata tra MCI e malattia di Alzheimer, salvo l'incremento di F4-NP nell'ippocampo dei pazienti con malattia di Alzheimer ¹⁶². Uno studio autoptico condotto su 7 soggetti con MCI, 6 pazienti affetti da malattia di Alzheimer e 7 controlli sani, omologhi per età, valutati i markers di lipoperossidazione (HNE e acroleina), ha rilevato un aumento significativo di questi, nei soggetti con MCI e nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer rispetto ai controlli ¹⁶³. In un altro lavoro di confronto tra malattia di Alzheimer e 10 controlli affetti da MCI, sono stati riscontrati elevati livelli di proteine carbonilate, MDA, e TBARs. Nella



discussione, gli autori affermano che: "I lavori precedentemente pubblicati si sono limitati alle forme precoci e avanzate di malattia di Alzheimer, sottostimando probabilmente il livello di danno ossidativo che si sviluppa con la progressione della malattia"¹⁶⁴. Ci sono, in fine, una serie di studi che dimostrano come la deposizione di A β induca perossidazione lipidica ^{87,165-168}.

6 - TRASPONIBILITA` A LIVELLO CENTRALE DI RISULTATI PERIFERICI

Nella malattia di Alzheimer, e piú in generale in tutte le malattie neurodegenerative, la ricerca di biomarkers periferici o l'esplorazione di meccanismi fisiopatologici attraverso di essi, solleva domande legate alla presenza della barriera ematoencefalica (BEE), una struttura complessa e specializzata nel filtrare in modo altamente selettivo le sostanze in grado di attraversarla, schermando in ultima analisi il sistema nervoso centrale dalla circolazione sistemica. ¹⁶⁹ Diversi studi dimostrano che lo stress ossidativo a livello encefalico e la malattia di Alzheimer sono in grado di alterare la permeabilità della BEE.¹⁷⁰⁻¹⁷³ Anche ammettendo la permeabilità della BEE, i markers di stress ossidativo originati a livello centrale si diluirebbero nel sangue dove una miriade di altri fattori contribuirebbero allo squilibrio tra produzione e rimozione di ossidanti.

I lavori sintetizzati nella precedente sezione suggeriscono che le anomalie legate all'età, che interessano i processi ossidativi, riguardino tanto il sistema nervoso centrale quanto altri tessuti, comprese le cellule del sangue. Gli eritrociti sono stati utilizzati spesso come "reporter passivo" dello stato ossidativo di tutto l'organismo sebbene non siano ancora stati compiutamente studiati nella malattia di Alzheimer e nell'invecchiamento in generale. ^{174,175} In condizioni fisiologiche, i globuli rossi, nei loro 120 giorni di vita, esercitano l'importante ruolo di scavenger circolanti essendo equipaggiati con antiossidanti non-enzimatici (come ad esempio



Documento firmato digitalmente da Francesco-Maria Serino

glutazione, tioredossina, acido ascorbico e vitamina E). Inoltre, rispetto ad altri tipi di cellule, i globuli rossi mostrano elevata attività degli enzimi antiossidanti, tra cui la SOD, sistema tioredossina reduttasi / perossiredossina, catalasi, GPx, GR, ossidoreduttasi di membrana plasmatica per ridurre ossidanti extracellulari ed il sistema metemoglobina reduttasi / NADH / glicolisi per mantenere emoglobina in forma Fe²⁺-attiva. ¹⁷⁶

Le ROS normalmente agiscono attivando il metabolismo fisiologico dei globuli rossi e, in tal modo, questi possono agire riducendo lo stress ossidativo di altre cellule.

Date le sue attività di distribuzione e trasporto in tutti i distretti dell'organismo, l'eritrocita può essere un eccellente reporter anche del contenuto di acidi grassi nelle membrane dei tessuti, in particolare di quelli non facilmente esplorabili come quello nervoso. ¹⁷⁷

7 - OBIETTIVI

La revisione sistematica presentata dimostra come elevati indici di stress ossidativo siano stati più volte riscontrati nelle patologie neurodegenerative (e nell'Alzheimer in particolare) sia a livello centrale, grazie a studi autoptici o su liquor cefalorachidiano, sia su tessuti periferici.

In particolare, uno dei dati più consistenti presenti in letteratura è l'aumento della MDA, sia nel plasma, sia negli eritrociti ed in altre cellule ematiche di soggetti affetti da malattia di Alzheimer ed altre patologie neurodegenerative.

Studi recenti hanno inoltre mostrato che i pazienti affetti da MCI presentano livelli di MDA intermedi rispetto a soggetti anziani sani e soggetti affetti da malattia di Alzheimer. Questo può suggerire che l'elevata perossidazione lipidica e la diminuzione delle difese antiossidanti



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

possano manifestarsi precocemente nella storia naturale di malattia di Alzheimer. La breve emivita della MDA nel plasma umano fa ragionevolmente ritenere che i suoi livelli possano riflettere il grado di perossidazione "istantaneo" sia nel plasma che nella membrana cellulare eritrocitaria. In uno studio pilota, non pubblicato, condotto dal Prof. Ettore Bergamini dell'Università di Pisa, le membrane purificate di eritrociti ("ghosts") di pazienti affetti da malattia di Alzheimer mostravano aumentata suscettibilità *ex vivo* alla perossidazione lipidica [(la produzione di MDA per unità di ghosts eritrocitari era significativamente più elevata (+30%, $P < 0.01$) in globuli rossi provenienti da pazienti affetti da malattia di Alzheimer rispetto a controlli omologhi per età (1.76 ± 0.05 vs 1.32 ± 0.08 $\mu\text{mol/ g/ min}$)].

Gli studi già presenti in letteratura, che abbiano valutato la suscettibilità alla perossidazione lipidica degli eritrociti prelevati da soggetti anziani o affetti da malattia di Alzheimer, si sono serviti di mezzi chimici per indurre stress ossidativo, in genere su eritrociti interi.

L'induzione di stress ossidativo mediante raggi ultravioletti è un metodo alternativo che presenta il vantaggio, rispetto ai mezzi chimici, di essere interamente controllabile, potendo produrre i suoi effetti solo durante l'irraggiamento. Inoltre l'utilizzo di membrane eritrocitarie isolate consente una maggiore specificità nella valutazione della MDA prodotta e permette di impiegare una quantità di sangue inferiore rispetto agli altri metodi attualmente in uso. Lo studio si propone di indagare l'alterazione dei meccanismi antiossidanti di membrana in pazienti affetti da malattia di Alzheimer e soggetti non dementi, mediante una metodica originale per lo studio *in vitro* del danneggiamento delle membrane eritrocitarie, sottoposte a foto-ossidazione tramite raggi ultravioletti.



8 - DISEGNO, MATERIALI E METODI

Studio osservazionale descrittivo, trasversale, monocentrico. Una volta ottenuto il consenso da parte del paziente, o del caregiver, sono stati eseguiti:

- Raccolta anamnesi ed esame obiettivo completi.
- Valutazione dello stato cognitivo tramite Mini Mental Status Exam (MMSE).
- Dosaggio della MDA in seguito a fotossidazione tramite irraggiamento UV-B (metodica descritta più avanti).
- Caratterizzazione degli acidi grassi di membrana (metodica descritta più avanti).

8.1 - Popolazione

I pazienti sono stati selezionati in base ai criteri di eleggibilità nell'ambito delle visite ambulatoriali dell'area di Neurologia del Policlinico Universitario Campus Bio-Medico. In tale occasione, il ricercatore ha proposto al paziente, od al suo rappresentante legale, la partecipazione allo studio, consegnando il consenso informato e spiegando in linguaggio non tecnico, in cosa consistesse la ricerca, quali parametri sarebbero stati valutati ed a quale scopo.

La partecipazione si è svolta su base totalmente volontaria e gratuita. Come controlli per i valori di MDA e per l'analisi lipidomica sono stati utilizzati i dati provenienti da soggetti non affetti da declino cognitivo, reclutati precedentemente nell'ambito di studi passati, presso l'Università Campus Bio-Medico ed il CNR di Bologna.



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

8.2 Criteri di inclusione

L'inclusione nello studio ha riguardato soggetti di entrambi i sessi, di età superiore ai 50 anni. Sono stati reclutati pazienti con diagnosi clinica possibile o probabile di malattia di Alzheimer, in accordo con i criteri NINCDS-ADRDA e le raccomandazioni emanate dal National Institute on Aging.^{178,179}

I pazienti dovevano esser stati sottoposti ad imaging cerebrale nei precedenti 12 mesi che escludesse altre potenziali cause di demenza, patologie cerebrovascolari, anomalie anatomiche congenite o acquisite e malattie demielinizzanti.

8.3 Criteri di esclusione

I soggetti che presentassero almeno una delle seguenti caratteristiche, non sono stati inclusi nello studio:

- Anamnesi recente di neoplasia (< 1 anno).
- Deficit di vitamina B12, sierologia positiva per sifilide, alterazioni della funzionalità tiroidea ritenute significative dal clinico esaminante.
- Utilizzo di integratori alimentari contenenti vitamine, minerali e/o oligoelementi
- Diagnosi di malnutrizione (sulla base dell'indice di massa corporea e di alterazioni della protidemia).
- Pazienti affetti da malattia infiammatoria cronica (es. artrite reumatoide) e altre patologie in fase acuta.
- Pazienti affetti da sindrome metabolica o diabete mellito.
- Soggetti in trattamento con terapia ormonale sostitutiva.
- Soggetti fumatori attuali o recenti (ovvero non fumatori da meno di un anno).



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

8.4 - Dosaggio della MDA prodotta dalle membrane eritrocitarie sottoposte a foto-ossidazione

Il prelievo dei campioni di sangue dei pazienti è stato fatto presso l'ambulatorio di Neurologia del Policlinico Universitario Campus Bio-Medico di Roma. Come controllo per il dosaggio della MDA sono stati utilizzati i dati provenienti da controlli sani, disponibili presso il laboratorio di Scienze Biochimiche dell'Università Campus Bio-Medico.

Il sangue venoso è stato ottenuto tramite prelievo venoso e tenuto nelle provette contenenti K2EDTA (BD Vacutainer®), anticoagulante utilizzato per evitare interferenze nell'esecuzione degli esami richiesti e per conservare al meglio la morfologia degli elementi cellulari per le indagini ematologiche. Il campione è stato mantenuto in ghiaccio.

La preparazione delle membrane eritrocitarie prevede in prima istanza una centrifugazione a 800 giri/min per 20 minuti a 4° C, per separare le componenti del sangue secondo il loro peso.

Dopo la centrifugazione sono stati recuperati dal fondo della fiala 500 µL di eritrociti impaccati, e sono stati aggiunti in una Falcon da 15 mL contenente 8,5 mL di acqua distillata, che era stata posta precedentemente in ghiaccio.

Il campione è stato mantenuto in ghiaccio per 20 minuti per ottenere la completa lisi ipotonica degli eritrociti.

Terminato il tempo è stato aggiunto al campione 1 mL di soluzione 2 M di KCl per aumentare la solubilità dell'emoglobina e facilitare il successivo lavaggio delle membrane, e la miscela è stata incubata per altri 5 minuti.

Precedentemente sono stati preparati i filtri, 0.2 µm di acetato di cellulosa, ponendoli in una piastra con 4 mL di soluzione fisiologica (0.9% NaCl).

È stato prelevato 1mL di emolizzato ed è stato sospeso al centro del filtro a membrana, successivamente è stato filtrato e lo strato sottile di



membrane eritrocitarie è stato risciacquato con 2000 μL soluzione fisiologica, fino ad eliminare l'emoglobina, ottenendo membrane incolori.

Il filtro è stato infine asciugato sotto vuoto e riposto nella piastra di Petri da 5 cm contenenti 4 ml di soluzione fisiologica ed è stato posto al buio.

Le piastre di Petri, contenenti i filtri con lo strato di membrane eritrocitarie, sono state poste sotto sorgente UV - B e irradiate senza coperchio superiore, per 40 minuti.

Per l'irradiazione è stata utilizzata una lampada contenente 313 tubi fluorescenti che emettono uno spettro continuo tra 280 e 320 nm.

Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato e per ogni campione è stato fatto un controllo negativo, che non è stato posto sotto irradiazione, che successivamente è stato sottratto ai valori ottenuti dai campioni posti sotto la lampada UV-B.

Alla fine del tempo di irraggiamento, sono stati prelevati 200 μL di soluzione da ciascuna piastra di Petri e sono stati posti in una Eppendorf da 2 mL.

Per la determinazione della concentrazione di MDA, prodotta in seguito a perossidazione dei lipidi di membrana eritrocitaria provocata dall'irradiazione ultravioletta, è stato utilizzato il dosaggio del acido tiobarbiturico (TBA), andando ad aggiungere ai 200 μL di soluzione lo stesso volume di TBA, 0,67 % (p/v) e scaldando la miscela a 90°centigradi per 40 minuti.

Quindi la soluzione è stata raffreddata ed immediatamente analizzata.

È stata fatta una determinazione spettrofluorimetrica dei TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), prodotti della reazione del TBA con MDA e altre sostanze acido tiobarbiturico-reattive, eseguita sullo strumento Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, CH).

Su una piastra è stato caricato un volume di 200 μL di campione per pozzetto.

La fluorescenza è stata rilevata regolando le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione a 515 nm e 550 nm, rispettivamente. Una curva di calibrazione standard MDA è stata costruita utilizzando la una soluzione



stock di 500 μM . Le soluzioni di lavoro MDA sono state preparate diluendo soluzione madre in acqua ottenendo concentrazioni che vanno da 0,1 a 10 μM .

La curva di calibrazione MDA è stata costruita tenendo conto dell'intervallo di concentrazione MDA di 0,01-1 μM .

8.5 - Caratterizzazione degli acidi grassi di membrana

La caratterizzazione della composizione lipidica della membrana eritrocitaria è stata condotta presso il laboratorio di lipidomica della Lipinutragen, un'azienda spin-off nata nel CNR di Bologna. È stata da principio eseguita la separazione della membrana eritrocitaria a partire da 1 mL di sangue intero centrifugato a 2000g per 5 minuti per separare il plasma, poi ricentrifugato a 4000g a 4 gradi per cinque minuti per ottenere una stratificazione cellulare in base alla densità. Lo strato inferiore (2.5 mm dal fondo della provetta) contiene cellule eritrocitarie. Di queste è stata selezionata una specifica frazione che consiste in cellule con diametro più piccolo di circa il 10% rispetto alla popolazione media degli eritrociti non selezionati. Il diametro è stato misurato tramite uno Scepter™ 2.0 Cell Counter (Millipore, Milan, Italy). Vengono successivamente eseguiti lavaggi delle cellule, lisi e separazione delle membrane, nonché l'estrazione dei fosfolipidi di membrana. L'analisi TLC (Thin Layer Chromatography) permette di verificare la presenza di fosfolipidi nell'estratto. Infine, viene eseguita la reazione di transesterificazione con una soluzione 0.5 M di KOH/Me per 10 minuti a temperatura ambiente per ottenere gli esteri metilici di acidi grassi (FAME - fatty acid methyl esters) e la loro finale estrazione utilizzando n-esano come solvente di estrazione. La fase di esano è stata raccolta e asciugata con Na_2SO_4 anidra. Dopo la filtrazione, il solvente è stato eliminato per evaporazione utilizzando un evaporatore a rotazione e il sottile film bianco di FAME è stato successivamente disciolto in un piccolo volume di

n-esano. Approssimativamente 1 mL di questa soluzione è stata iniettata nel gascromatografo con rilevatore a ionizzazione di fiamma e una colonna capillare Rtx-2330 (90% biscyanopropyl-10% phenylcyanopropyl polysiloxane; 60 m, 0.25 mm i.d., 0.20 mm di spessore del film) utilizzato per l'analisi. La temperatura è stata mantenuta a 165° per i primi 3 minuti e successivamente incrementata di 1°C/min fino a 195°C. Questa temperatura è stata mantenuta per 40 minuti e poi è stato eseguito un ulteriore incremento di 10°C/min fino alla temperatura di 250°C che è stata mantenuta per 5 minuti. Come gas vettore è stato utilizzato elio, mantenuto a una pressione costante di 29 psi. I metil esteri sono stati identificati per confronto coi tempi di ritenzione degli standard disponibili in commercio.

I valori ottenuti dai campioni biologici sono espressi come percentuale relativa di ciascun acido grasso sul totale degli acidi grassi considerati (% rel). L'analisi lipidomica valuta gli acidi grassi più significativi presenti nella membrana eritrocitaria, e li pone pari a 100.



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

Tabella 1 (esempio di referto di analisi lipidomica)

ACIDI GRASSI		Valori trovati	Valori ottimali(a)	Variazione
Acidi grassi saturi (SFA)	Palmitico (16:0)	24.9	17 - 27	
	Stearico (18:0)	17.3	13 - 20	
Acidi grassi monoinsaturi (MUFA)	Palmitoleico (16:1)	0.2	0.2 - 0.5	
	Oleico (9c 18:1)	17.6	9 - 18	
	Vaccenico (11c 18:1)	1.5	0.7 - 1.3	+15.38 %
Acidi grassi polinsaturi (PUFA) omega-6	Linoleico (18:2)	10.6	9 - 16	
	DGLA (20:3)	1.4	1.9 - 2.4	-26.32 %
	Arachidonico (20:4)	18.2	13 - 17	+7.06 %
Acidi grassi polinsaturi (PUFA) omega-3	EPA (20:5)	1.1	0.5 - 0.9	+22.22 %
	DHA (22:6)	7.1	5 - 7	+1.43 %
Isomeri Trans Stress radicali liberi	TRANS 18:1	0.1	0 - 0.3	
	TRANS 20:4	0.1	0 - 0.4	
	Total TRANS	0.2	0 - 0.4	
FAMIGLIE	Tot SFA	42.2	30 - 45	
	Tot MUFA	19.3	13 - 23	
	Tot PUFA	38.4	28 - 39	



8.6 - VALUTAZIONE DELLO STATO COGNITIVO

Il Mini Mental State Examination (MMSE), sviluppato da Folstein nel 1975¹⁸⁰ è attualmente lo strumento più utilizzato, a livello mondiale, per lo screening generale delle funzioni cognitive e per quello relativo al decadimento cognitivo (valutazione trasversale) nel singolo individuo, oltre che per seguire un paziente nel tempo (valutazione longitudinale).

Il MMSE è utilizzato sia come strumento di screening che per monitorare la progressione nei soggetti con demenza.

Il test è costituito da trenta item (domande), in parte verbali e in parte di performance che fanno riferimento a sette aree cognitive differenti:

1. orientamento nel tempo
2. orientamento nello spazio
3. registrazione di parole
4. attenzione e calcolo
5. rievocazione
6. linguaggio
7. prassia costruttiva

Il punteggio totale è compreso tra un minimo di 0 ed un massimo di 30 punti.

Un punteggio uguale o inferiore a 18 è indice di una grave compromissione delle abilità cognitive; un punteggio compreso tra 18 e 24 è indice di una compromissione da moderata a lieve, un punteggio pari a 25 è considerato borderline, da 26 a 30 è indice di normalità cognitiva.

Tabella 2

PUNTEGGIO MMSE	
≤ 18	grave compromissione
18 - 24	moderata - lieve
25	borderline
26 - 30	nessuna compromissione

Le indicazioni sono comunque orientative, essendo presenti dei fattori di taratura legati all'età ed alla scolarità del soggetto.

Il MMSE è uno strumento di screening per separare i pazienti con declino cognitivo privi di alcuna compromissione.

Inoltre, quando usato ripetutamente lo strumento è in grado di misurare quelle variazioni dello stato cognitivo che possano beneficiare di un intervento. Tuttavia, lo strumento non è in grado di diagnosticare il caso di cambiamenti nella funzione cognitiva e non deve sostituire una valutazione clinica completa di stato mentale.

Inoltre, lo strumento dipende fortemente dalla risposta verbale, dalla lettura e dalla scrittura.

Dunque, pazienti che non vedenti, intubati, che hanno una bassa alfabetizzazione, o quelli che presentano altri disturbi della comunicazione possono svolgere male il test anche quando non hanno una compromissione cognitiva.

9 - RISULTATI

9.1 Analisi descrittiva

E' stato raccolto un campione di 15 pazienti affetti da malattia di Alzheimer, composto da 6 donne (40%) e 9 uomini. L'età media era di 74.8 ± 4.9 anni.

Le principali comorbidità erano:

Patologie cardiovascolari 33%; Allergie 13%; Dislipidemia 10%; Patologie apparato respiratorio 0.6%. Dai valori di MMSE (Mini-Mental State Examination) si nota che in media la compromissione delle abilità cognitive era di grado moderato lieve: si è ottenuto infatti un valore di $22.6 \pm 4,8$; il range di normalità è posto tra 26 e 30.

9.2 - Dosaggio della MDA

La media della concentrazione di MDA prodotta dalle membrane eritrocitarie sottoposte a fotossidazione ex vivo, è risultata, nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer di $0.35 \mu\text{M} \pm 0.12$.

Si è voluto verificare se vi fossero differenze statisticamente significative tra i valori di MDA, nei soggetti affetti da malattia di Alzheimer, e 28 controlli sani, non affetti da malattia neurodegenerativa, i cui dati relativi al saggio della MDA in seguito a fotossidazione erano disponibili da precedenti studi eseguiti presso lo stesso laboratorio, con la medesima metodica sopra descritta. La significatività è stata valutata utilizzando le seguenti soglie di livello di errore di primo tipo: debole (0.10-0.05), significativa (0.05-0.01), forte (< 0.01). Nel gruppo di controllo la concentrazione media di MDA prodotta dalle membrane eritrocitarie

sottoposte a fotossidazione ex vivo è risultata di $0.56 \mu\text{M} \pm 0.13$. Il t test ha mostrato che i gruppi sono statisticamente differenti in media (P value < 0.001) poichè il gruppo di pazienti ha mostrato un dosaggio inferiore rispetto ai controlli.

9.3 - Analisi lipidomica: caratterizzazione degli acidi grassi di membrana eritrocitaria

E' stata eseguita l'analisi della composizione lipidica delle membrane eritrocitarie dei soggetti affetti da malattia di Alzheimer. Ciascun acido grasso è stato espresso come percentuale relativa sul totale degli acidi grassi considerati (% rel).

Si è voluto quindi verificare se vi fossero differenze statisticamente significative tra i valori dei diversi acidi grassi nei soggetti affetti da malattia di Alzheimer e un gruppo di 54 soggetti di controllo non affetti da patologia neurodegenerativa, composto da 40 femmine (74%) e 14 maschi. L'età media era di 66 ± 10.7 anni. La significatività è stata valutata utilizzando le seguenti soglie di livello di errore di primo tipo: debole (0.10-0.05), significativa (0.05-0.01), forte (< 0.01).

9.3.1 - ACIDO PALMITICO (16:0)

La percentuale relativa di acido palmitico sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 24 ± 1.3 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 27 ± 2.6 . Il t test ha mostrato che i gruppi sono statisticamente differenti in media (P value < 0.001) poichè il gruppo di pazienti ha mostrato un percentuale relativa di acido palmitico inferiore rispetto ai controlli.

9.3.2 - ACIDO STEARICO (18:0)

La percentuale relativa di acido stearico sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 18 ± 1.3 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 17 ± 1.5 . Il t.test mostra che le differenze tra i gruppi non sono statisticamente significative.

9.3.3 - ACIDO PALMITOLEICO (16:1 Δ 9)

La percentuale relativa di acido palmitoleico sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 0.45 ± 0.12 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 0.40 ± 0.13 . Il t.test mostra che le differenze tra i gruppi non sono statisticamente significative.

9.3.4 - ACIDO OLEICO (18:1 Δ 9)

La percentuale relativa di acido oleico sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 18 ± 1.4 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 18 ± 1.8 . Il t.test mostra che le differenze tra i gruppi non sono statisticamente significative.

9.3.5 - ACIDO VACCENICO (18:1 Δ 11)

La percentuale relativa di acido vaccenico sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 1.6 ± 0.21 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 1.5 ± 0.32 . Il t.test mostra che le differenze tra i gruppi non sono statisticamente significative.

9.3.6 - ACIDO LINOLEICO (18:2- Δ 9,12)

La percentuale relativa di acido linoleico sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 11 ± 2 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 11 ± 1.4 . Il t.test mostra che le differenze tra i gruppi non sono statisticamente significative.

9.3.7 - ACIDO DIOMO- γ -LINOLENICO (DGLA; 20:3)

La percentuale relativa di acido diomo- γ -linolenico sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 2.2 ± 0.35 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 1.9 ± 0.42 . Il t test ha mostrato che i gruppi sono statisticamente differenti in media (P value <0.001 poichè il gruppo di pazienti ha mostrato un percentuale relativa di diomo- γ -linolenico superiore rispetto ai controlli.

9.3.8 - ACIDO ARACHIDONICO (AA; 20:4)

La percentuale relativa di acido arachidonico sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 19 ± 2.1 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 16 ± 2.2 . Il t test ha mostrato che i gruppi sono statisticamente differenti in media (P value <0.001 poichè il gruppo di pazienti ha mostrato un percentuale relativa di acido arachidonico superiore rispetto ai controlli.

9.3.9 - ACIDO EICOSAPENTAENOICO (EPA; 20:5)

La percentuale relativa di EPA sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 0.93 ± 0.5 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 0.93 ± 0.59 . Il t.test mostra che le differenze tra i gruppi non sono statisticamente significative.



Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

9.3.10 - ACIDO DOCOSAESAENOICO (DHA; 22:6)

La percentuale relativa di DHA sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 5.4 ± 1.3 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 5.6 ± 1.4 . Il t.test mostra che le differenze tra i gruppi non sono statisticamente significative.

9.3.11 - ACIDI GRASSI TRANS (trans-18:1 - acido elaidico)

La percentuale relativa di acidi trans sul totale degli acidi grassi considerati (% rel) è risultata nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer pari a 0.12 ± 0.06 mentre nel gruppo di controllo è risultata di 0.12 ± 0.07 . Il t.test mostra che le differenze tra i gruppi non sono statisticamente significative.

10 - DISCUSSIONE

Questa ricerca è partita da un dato ottenuto in uno studio pilota: nella malattia di Alzheimer sono presenti segni di aumentata suscettibilità delle membrane eritrocitarie allo stress fotossidativo. Tale osservazione risultava coerente con la letteratura disponibile che mostra un generale aumento dei livelli di stress ossidativo, reperibili sia a livello centrale sia in periferia.

I risultati ottenuti nel presente lavoro, tuttavia, hanno mostrato nei pazienti affetti da Alzheimer, una produzione di MDA da parte delle membrane eritrocitarie, inferiore rispetto ai controlli, suggerendo così una suscettibilità minore al danno ossidativo. Questo dato, opposto a quello atteso, può avere varie spiegazioni.

Tutti i pazienti inclusi nello studio erano sotto trattamento con inibitori dell'acetilcolinesterasi o del recettore per l'NMDA (n-metil-D-aspartato). Pochissimi studi clinici disponibili in letteratura si sono occupati della



influenza di questi farmaci sul bilancio ossidativo nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer. Uno studio recente ha mostrato che un trattamento di 6 mesi con memantina era in grado di ridurre la velocità di ossidazione dei lipidi plasmatici, nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer.¹⁸¹

La tipizzazione degli acidi grassi di membrana ci ha consentito di escludere che la differenza osservata possa essere attribuibile a differenze nella composizione dei PUFA, da cui la MDA potrebbe derivare dopo foto-ossidazione (serie omega-3 e omega-6). In più, il dato relativo all'AA (incrementato nel gruppo con malattia) dovrebbe addirittura implicare una maggiore suscettibilità al danno ossidativo proprio per maggiore disponibilità di substrato ossidativo (sebbene una recente revisione sistematica riporti che l'aumento dell'introito di PUFA alimentari, pur aumentando la quota di lipidi di membrana suscettibili al danno ossidativo, non comporti in realtà un aumento della lipoperossidazione).

¹⁸²

Esistono prove in letteratura di cambiamenti adattativi in risposta all'aumentato stress ossidativo presente nella malattia. Queste prove riguardano principalmente l'aumento di sistemi riparativi e antiossidanti riscontrati sia in alcune aree cerebrali.¹⁸³

L'acido palmitico è risultato inferiore nei malati rispetto ai controlli. In letteratura è descritto il ritrovamento di elevate percentuali di acido palmitico nei grovigli neurofibrillari.¹⁸⁴ Inoltre, in modelli sperimentali, astrociti trattati con l'acido palmitico è in grado di provocare upregulation di BACE1 con conseguente aumento del processamento amiloidogenico della APP.^{184,185}

DGLA e AA sono risultati aumentati nel campione di pazienti affetti da malattia di Alzheimer. La pista Omega-6 prevede innanzitutto la formazione di acido γ linolenico (GLA; 6c,9c,12c-C18:3) per azione dell'enzima delta-6 desaturasi. Successivamente si ha l'intervento dell'elongasi che porta alla sintesi di DGLA e da questo, tramite delta-5 desaturasi, viene aggiunto un quarto doppio legame, con formazione di

AA. Osservando quindi la pista Omega-6 non stupisce l'incremento di AA, che deriva come detto dalla conversione del DGLA per azione della delta 5-desaturasi. Di maggiore interesse è l'incremento del DGLA che potrebbe dipendere da un aumento di attività dell'enzima delta-6 desaturasi + elongasi. Tale dato è in apparente contraddizione con la nota (e più volte descritta) riduzione di attività della delta-6 desaturasi nell'invecchiamento (tanto da essere stata indicata come marker di invecchiamento) e nelle patologie neurodegenerative in particolare.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

È interessante notare che il DGLA esercita un'azione inibente sulla PLA2 e determina un blocco della cascata dell'acido arachidonico con effetto antinfiammatorio. Nella malattia di Alzheimer i prodotti della PLA2 e i loro metaboliti sono stati associati a diversi aspetti patogenetici rilevanti. In studi post mortem è stato osservato un aumento della immunoreattività della PLA2 citosolica nei soggetti affetti da malattia di Alzheimer.¹⁸⁹

La PLA2 citosolica è stata anche identificata come un mediatore chiave nella morte neuronale indotta dagli oligomeri di A β , agendo in una cascata che coinvolge la formazione di specie reattive dell'ossigeno, fino all'attivazione di un pathway sfingomielinasi-ceramide che innesca l'apoptosi.¹⁹⁰ In un modello sperimentale murino ('J20') in cui si osserva una produzione sensibilmente aumentata di A β , è stato osservato un incremento di AA e dei suoi metaboliti, in particolare a livello dell'ippocampo. Tali esperimenti hanno permesso poi di identificare una specifica isoforma di PLA2 (GIVA) che è iperespressa a livello cerebrale e iperattivata nella malattia di Alzheimer.¹⁹¹ L'ablazione genetica di GIVA permette, sempre nel modello J20, un sensibile miglioramento cognitivo, nonostante mantenga un'alta produzione di A β .¹⁹²



11 - CONCLUSIONI

I dati ottenuti sembrano deporre per una alterazione in senso protettivo dell'apparato antiossidante e della composizione di membrana eritrocitaria. Tale dato andrà innanzitutto confermato con l'ampliamento del campione di soggetti affetti da malattia di Alzheimer e con il reclutamento di un gruppo di soggetti di controllo opportunamente omologato per età e sesso.

Sarà inoltre utile valutare l'effetto della progressione della malattia sui marker considerati.

Tesi di dottorato in Scienze biochimiche e tecnologiche applicate agli alimenti ed alla nutrizione, di Francesco Maria Serino, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.



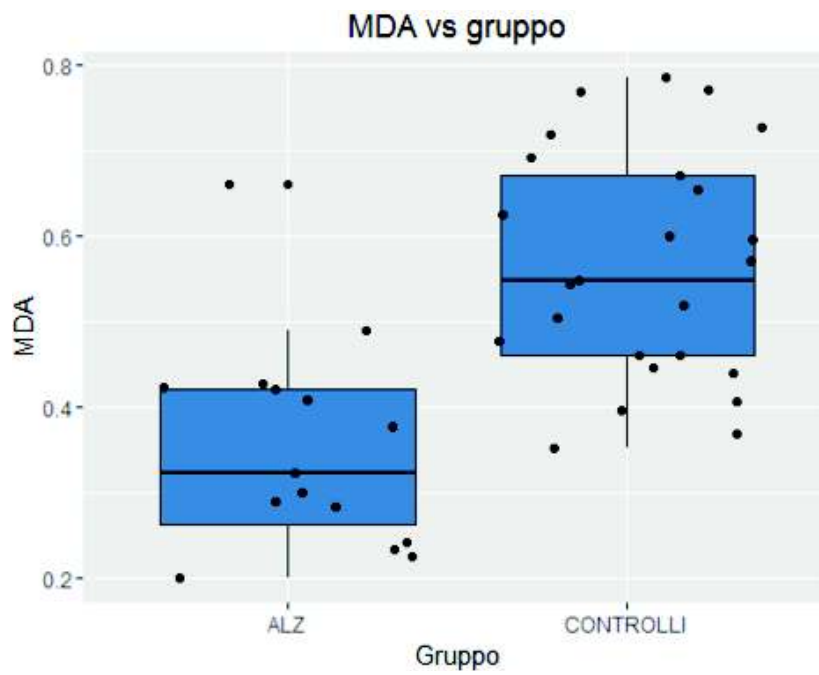
Documento firmato digitalmente da Francesco Maria Serino.

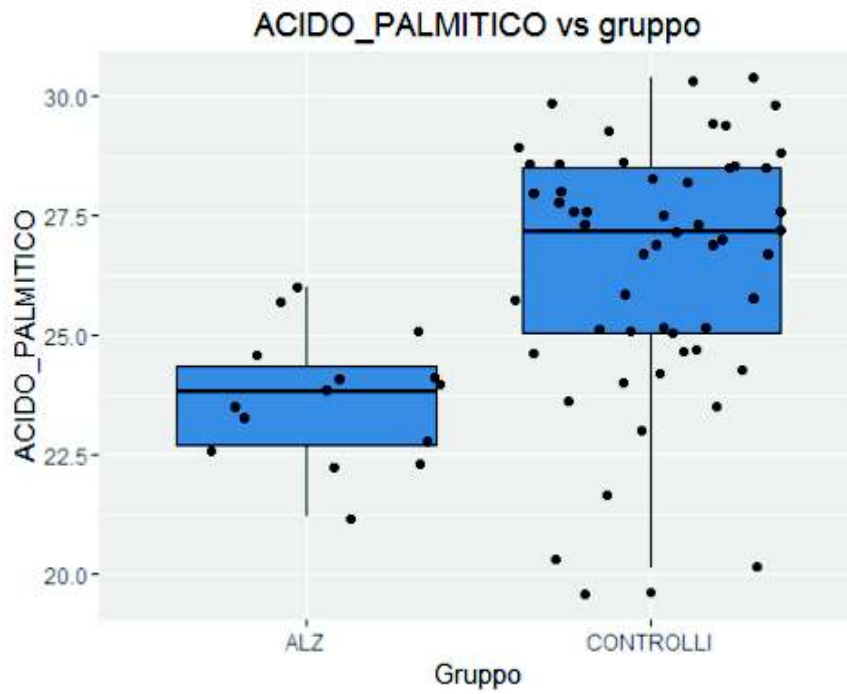
ALLEGATI - TABELLE E FIGURE

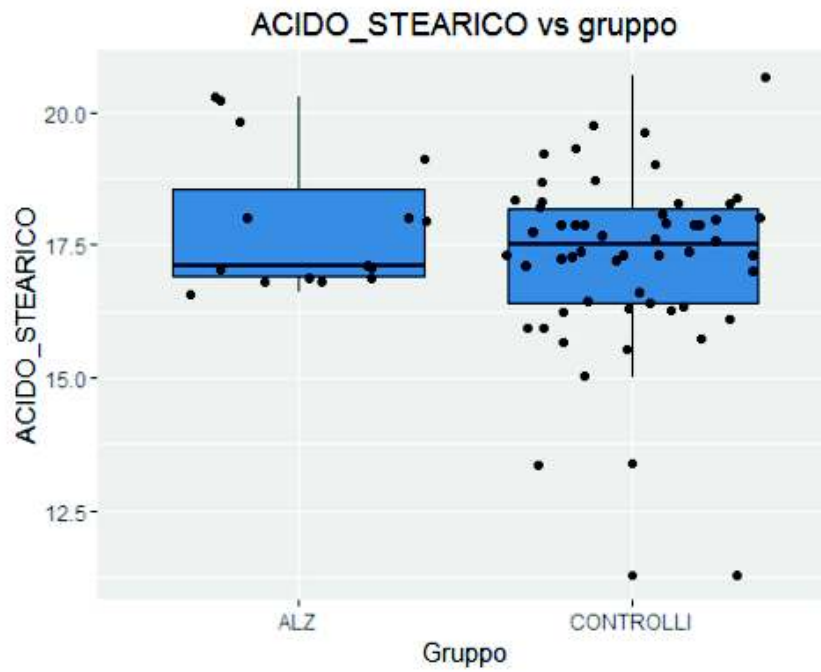
Tabella 3

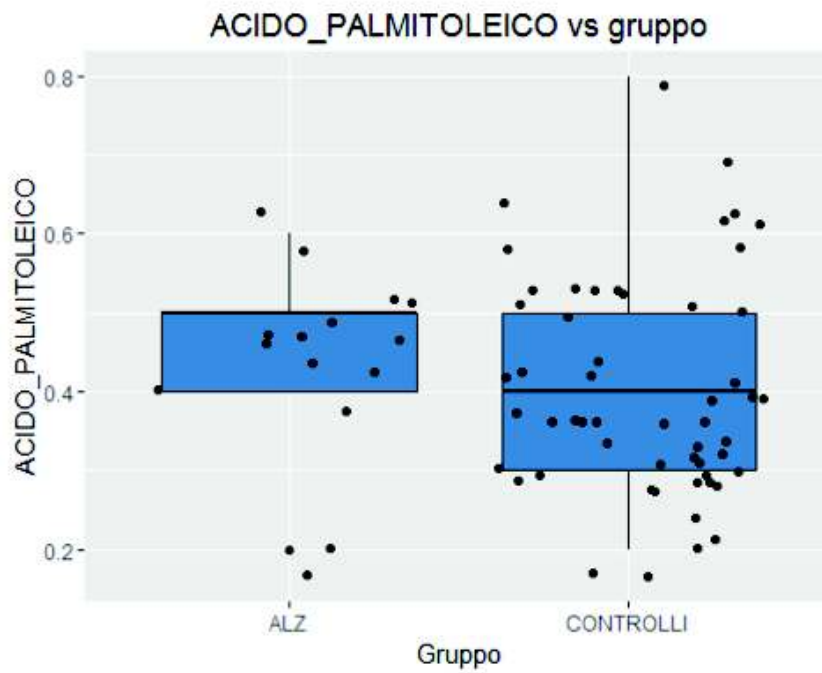
	ALZ		CONTROLLI		P VALUE
	MEDIA	±SD	MEDIA	±SD	
MDA [§]	0.35	0.12	0.56	0.13	<0.001*
ACIDO PALMITICO	24	1.3	27	2.6	<0.001*
DGLA	2.2	0.35	1.9	0.42	<0.001*
ACIDO ARACHIDONICO	19	2.1	16	2.2	<0.001*
ACIDO STEARICO	18	1.3	17	1.5	0.16
ACIDO PALMITOLEICO	0.45	0.12	0.4	0.13	0.22
ACIDO OLEICO	18	1.4	18	1.8	0.21
ACIDO VACCENICO	1.6	0.21	1.5	0.32	0.6
ACIDO LINOLEICO	11	2	11	1.4	0.24
EPA	0.93	0.5	0.93	0.59	0.99
DHA	5.4	1.3	5.6	1.4	0.76
TRANS	0.12	0.06	0.12	0.07	0.93

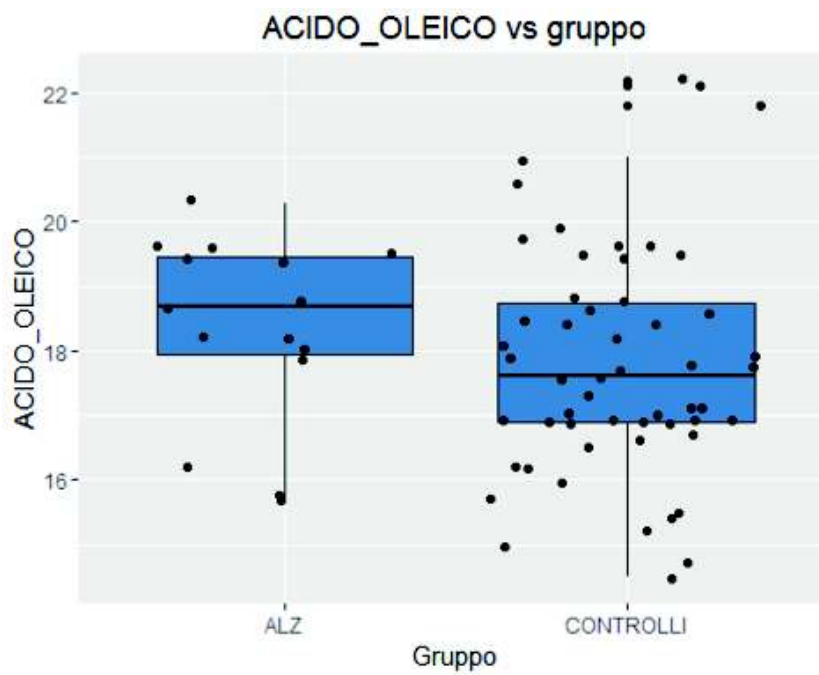
Osservazioni su AD (n=15) e controlli (n=54). §MDA su campione malattia di Alzheimer (n=15) e controlli (n=28).

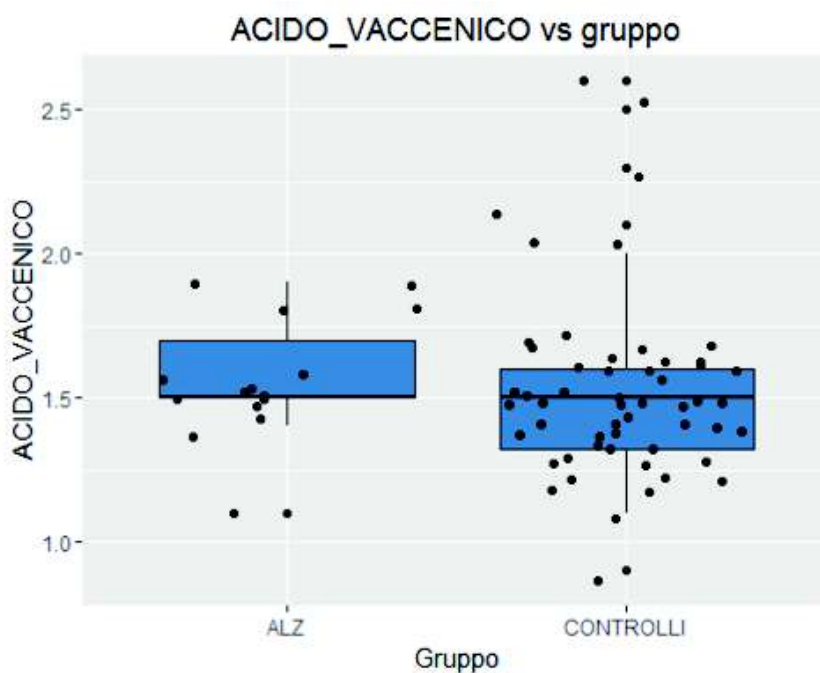


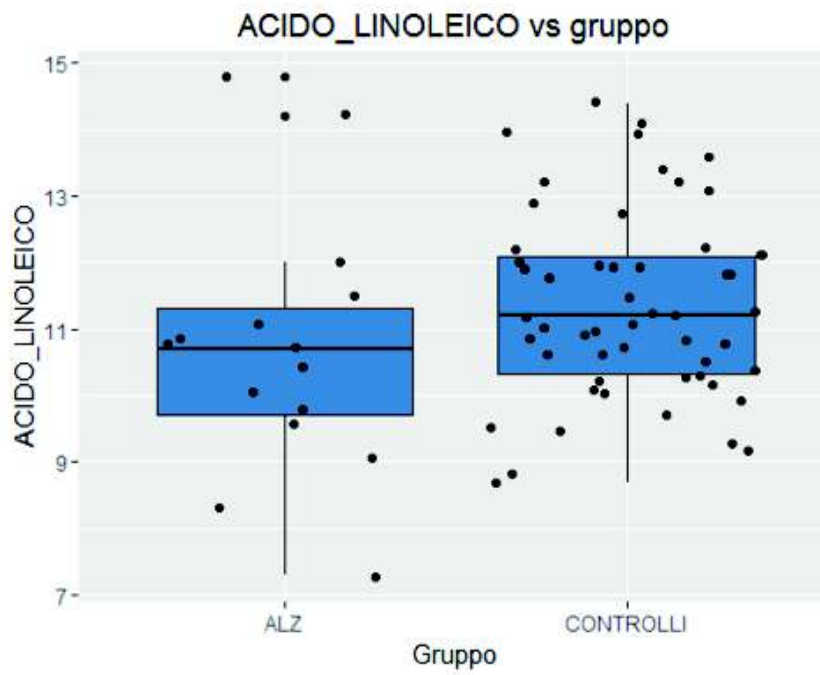


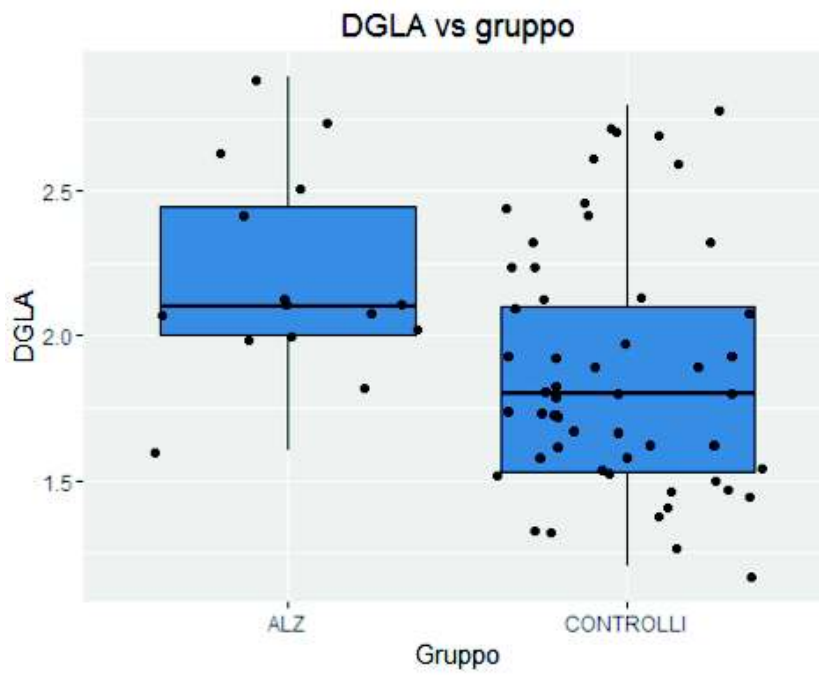


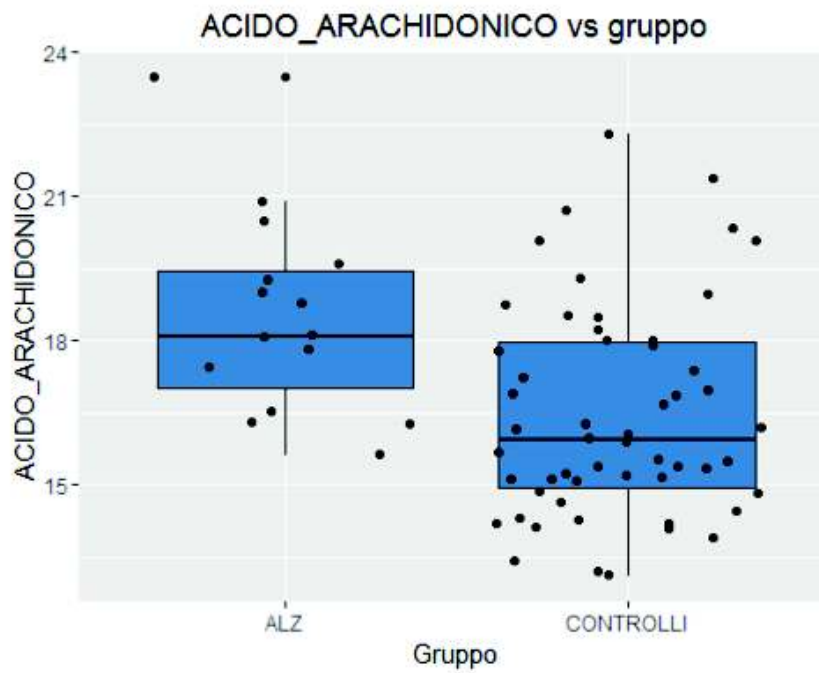


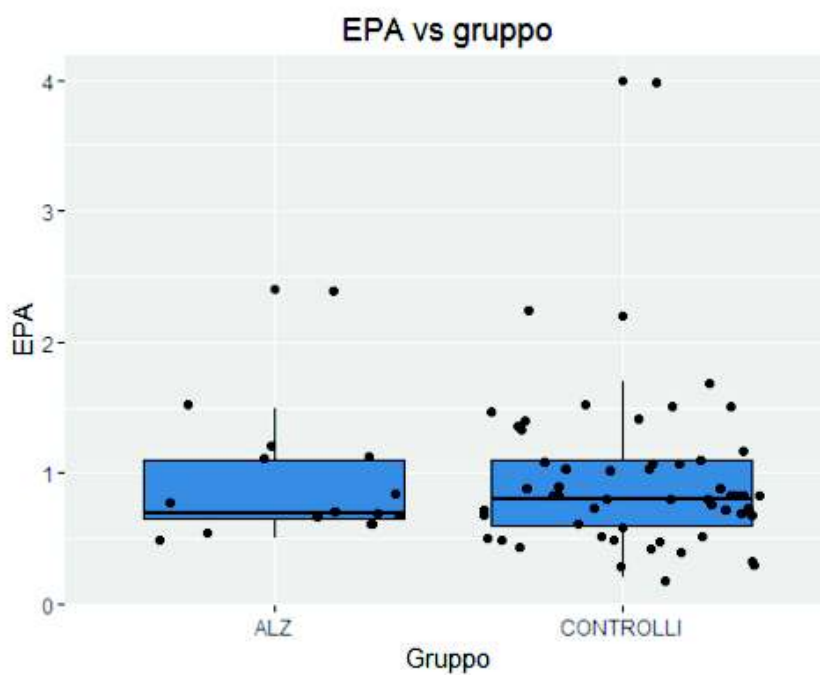


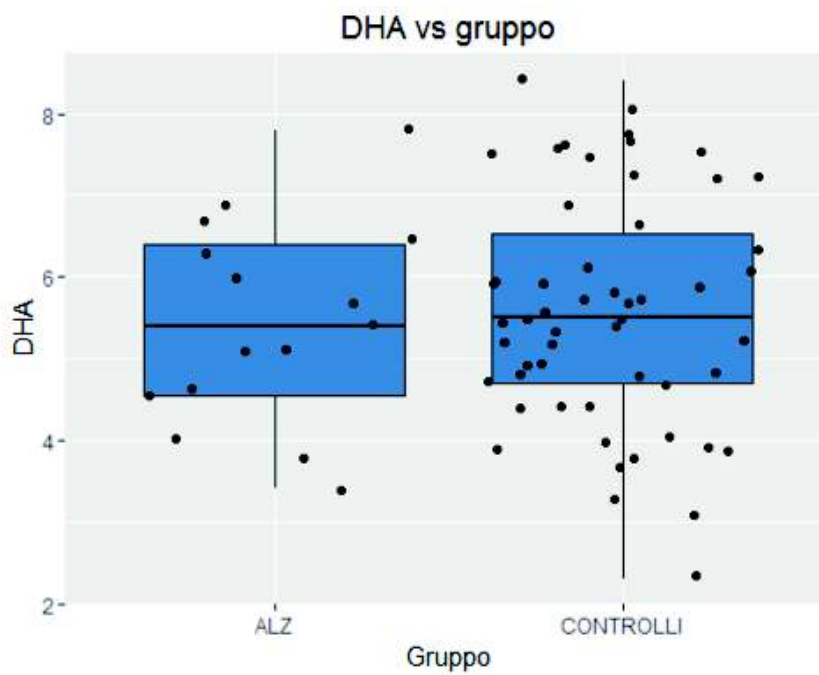


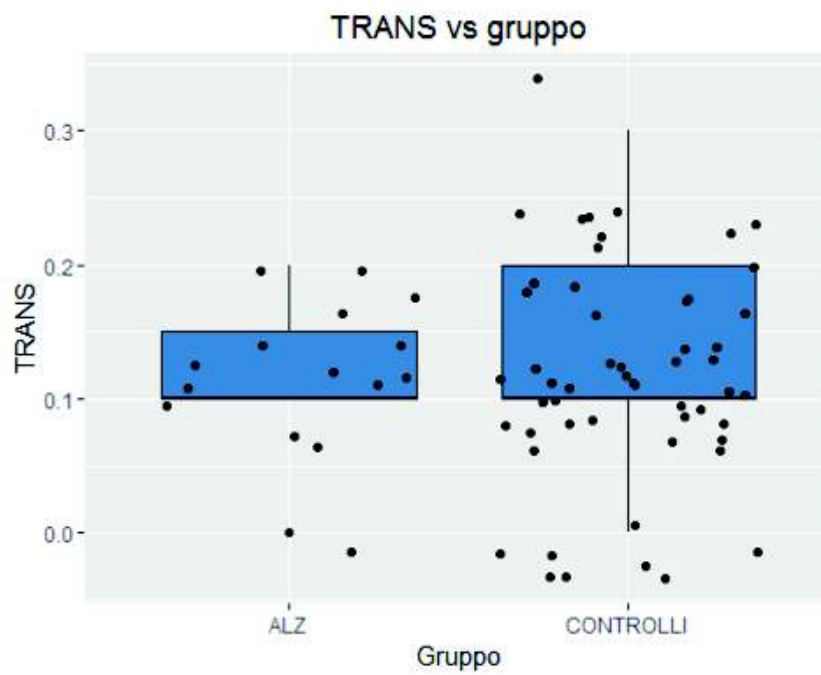












Ringraziamenti

Ringrazio per il supporto, la guida e soprattutto la pazienza:

Prof. Raffaele Antonelli Incalzi, Prof. Ettore Bergamini, Prof.ssa Marina Dachà e Prof.ssa Laura De Gara.

Prof.ssa Laura Dugo e Prof.ssa Chiara Fanali.

Dott. Simone Grasso e Dott.ssa Valentina Pasqualetti.

Prof.ssa Carla Ferreri e Dott.ssa Valentina Sunda (Lipinutragen C.N.R.).

Un ringraziamento particolare alla Dott.ssa Francesca Ursini e alla Dott.ssa Silvia Bernardini.



Documento Firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

BIBLIOGRAFIA

1. Bachman, D. L. *et al.* Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: The Framingham Study. *Neurology* **43**, 515–515 (1993).
2. Hebert, L. E. Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *JAMA* **273**, 1354–1359 (1995).
3. Nelson, P. T. *et al.* Hippocampal sclerosis in advanced age: clinical and pathological features. *Brain* **134**, 1506–1518 (2011).
4. Savica, R. *et al.* Incidence and Pathology of Synucleinopathies and Tauopathies Related to Parkinsonism. *JAMA Neurol.* **70**, 859 (2013).
5. Website. at <Australian Bureau of Statistics. Causes of death, Australia, 2013. ABS [online], <http://www.abs.gov.au/ausstats/abs.nsf/Lookup/by%20Subject/3303.0~2013~Main%20Features~Dementia%20and%20Alzheimer%20disease%20%2>>
6. Satizabal, C. L. *et al.* Incidence of Dementia over Three Decades in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* **374**, 523–532 (2016).
7. Website. at <Prince, M. *et al.* World Alzheimer Report 2015. Alzheimer's Disease International [online], <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf> (2015)>
8. Norton, S. *et al.* Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol.* **13**, 788–794 (2014).
9. Ngandu, T. *et al.* A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised

- controlled trial. *Lancet* **385**, 2255–2263 (2015).
10. Masters, C. L. *et al.* Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 4245–4249 (1985).
11. Grundke-Iqbal, I. *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 4913–4917 (1986).
12. Golde, T. E., Eckman, C. B. & Younkin, S. G. Biochemical detection of A β isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1502**, 172–187 (2000).
13. Holtzman, D. M., Bales, K. R., Paul, S. M. & DeMattos, R. B. A β immunization and anti-A β antibodies: potential therapies for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1603–1613 (2002).
14. Scheuner, D. *et al.* Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2**, 864–870 (1996).
15. Kumar-Singh, S. *et al.* Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A β 42 and decreased A β 40. *Hum. Mutat.* **27**, 686–695 (2006).
16. Wisniewski, K. E., Wisniewski, H. M. & Wen, G. Y. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* **17**, 278–282 (1985).

17. Jonsson, T. *et al.* A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96–99 (2012).
18. Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E. & Ikeda, K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* **541**, 163–166 (1991).
19. Saunders, A. M. *et al.* Association of apolipoprotein E allele 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467–1467 (1993).
20. Pitas, R. E., Boyles, J. K., Lee, S. H., Hui, D. & Weisgraber, K. H. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J. Biol. Chem.* **262**, 14352–14360 (1987).
21. Huang, Y., Yadong, H., Weisgraber, K. H., Lennart, M. & Mahley, R. W. Apolipoprotein E: Diversity of Cellular Origins, Structural and Biophysical Properties, and Effects in Alzheimer's Disease. *J. Mol. Neurosci.* **23**, 189–204 (2004).
22. Fernández-Miranda, C. *et al.* Changes in phenotypes of apolipoprotein E and apolipoprotein(a) in liver transplant recipients. *Clin. Transplant.* **11**, 325–327 (1997).
23. Farrer, L. A. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* **278**, 1349–1356 (1997).
24. Corder, E. H. *et al.* Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for

- late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* **7**, 180–184 (1994).
25. Ashford, J. W. & Wesson Ashford, J. APOE Genotype Effects on Alzheimer's Disease Onset and Epidemiology. *J. Mol. Neurosci.* **23**, 157–166 (2004).
26. Holtzman, D. M. *et al.* Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2892–2897 (2000).
27. Holtzman, D. M. Role of apoE/A β Interactions in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Cerebral Amyloid Angiopathy. *J. Mol. Neurosci.* **17**, 147–155 (2001).
28. Ryman, D. C. *et al.* Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* **83**, 253–260 (2014).
29. Jankowsky, J. L. *et al.* Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 159–170 (2004).
30. Borchelt, D. R. *et al.* Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17**, 1005–1013 (1996).
31. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300 (1956).
32. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. & Fenn, W. O. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* **119**, 623–626 (1954).
33. McCord, J. M., Keele, B. B. & Fridovich, I. An Enzyme-Based Theory of Obligate Anaerobiosis: The Physiological Function of Superoxide Dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **68**,

- 1024–1027 (1971).
34. Finkel, T. Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 248–253 (1998).
35. Turrens, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* **17**, 3–8 (1997).
36. Boveris, A. & Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J* **134**, 707–716 (1973).
37. Chae, H. Z., Kang, S. W. & Rhee, S. G. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol.* **300**, 219–226 (1999).
38. Sies, H. & Helmut, S. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **91**, S31–S38 (1991).
39. Yan, L. J., Levine, R. L. & Sohal, R. S. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11168–11172 (1997).
40. Beckman, K. B. & Ames, B. N. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547–581 (1998).
41. Dröge, W. Redox regulation in anabolic and catabolic processes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **9**, 190–195 (2006).
42. Forman, H. J. & Torres, M. Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med.* **22**, 189–216 (2001).
43. Thannickal, V. J. & Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, L1005–28 (2000).
44. Meng, T.-C., Fukada, T. & Tonks, N. K. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol. Cell* **9**, 387–399



(2002).

45. Pantano, C., Reynaert, N. L., van der Vliet, A. & Janssen-Heininger, Y. M. W. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1791–1806 (2006).
46. Liu, B., Bin, L., Yumin, C. & St. Clair, D. K. ROS and p53: A versatile partnership. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 1529–1535 (2008).
47. Bredt, D. S. & Snyder, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 175–195 (1994).
48. Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109–142 (1991).
49. Ledo, A., Barbosa, R. M., Gerhardt, G. A., Cadenas, E. & Laranjinha, J. Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17483–17488 (2005).
50. Ignarro, L. J. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. (Academic Press, 2009).
51. Radi, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4003–4008 (2004).
52. Cassina, A. M. *et al.* Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **275**, 21409–21415 (2000).
53. Serrano, F. & Klann, E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res. Rev.* **3**, 431–443 (2004).
54. Zecca, L., Youdim, M. B. H., Riederer, P., Connor, J. R. & Crichton, R. R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 863–873 (2004).

55. Trojanowski, J. Q. & Mattson, M. P. Overview of protein aggregation in single, double, and triple neurodegenerative brain amyloidoses. *Neuromolecular Med.* **4**, 1–6 (2003).
56. Butler, R. N. *et al.* Longevity genes: from primitive organisms to humans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **58**, 581–584 (2003).
57. Kyng, K. J. & Bohr, V. A. Gene expression and DNA repair in progeroid syndromes and human aging. *Ageing Res. Rev.* **4**, 579–602 (2005).
58. Wolkow, C. A. Life span: getting the signal from the nervous system. *Trends Neurosci.* **25**, 212–216 (2002).
59. Gamba, P. *et al.* Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* **7**, (2015).
60. Zelman, F. P., Thienhaus, O. J. & Bosmann, H. B. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res.* **476**, 160–162 (1989).
61. Lovell, M. A., Xie, C. & Markesbery, W. R. Acrolein, a product of lipid peroxidation, inhibits glucose and glutamate uptake in primary neuronal cultures. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 714–720 (2000).
62. Keller, J. N. *et al.* Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J. Neurochem.* **69**, 273–284 (1997).
63. Ermak, G. & Davies, K. J. A. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol. Immunol.* **38**, 713–721 (2002).
64. LaFerla, F. M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 862–872 (2002).
65. Kamat, P. K. *et al.* Mechanism of Oxidative Stress and Synapse

- Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Mol. Neurobiol.* **53**, 648–661 (2014).
66. Suzuki, Y. J., Forman, H. J. & Alex, S. Oxidants as Stimulators of Signal Transduction. *Free Radical Biology and Medicine* **22**, 269–285 (1997).
67. Lewén, A., Matz, P. & Chan, P. H. Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotrauma* **17**, 871–890 (2000).
68. Yamamoto, K. *et al.* The hydroxyl radical scavenger Nicaraven inhibits glutamate release after spinal injury in rats. *Neuroreport* **9**, 1655–1659 (1998).
69. Mattson, M. P. & Chan, S. L. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* **34**, 385–397 (2003).
70. Mattson, M. P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* **3**, 65–94 (2003).
71. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* (Oxford University Press, USA, 2015).
72. Barnham, K. J., Masters, C. L. & Bush, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 205–214 (2004).
73. Gregersen, N., Niels, G. & Peter, B. in *Methods in Molecular Biology* 3–23 (2010).
74. Higa, A., Arisa, H. & Eric, C. Redox signaling loops in the unfolded protein response. *Cell. Signal.* **24**, 1548–1555 (2012).
75. Bhandary, B., Bidur, B., Anu, M., Hyung-Ryong, K. & Han-Jung, C. An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 434–456 (2012).
76. Shang, F., Fu, S. & Allen, T. Ubiquitin–proteasome pathway and cellular

- responses to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **51**, 5–16 (2011).
77. Wang, X. *et al.* Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1842**, 1240–1247 (2014).
78. Malm, T. *et al.* Activation of the nuclear receptor PPAR δ is neuroprotective in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease through inhibition of inflammation. *J. Neuroinflammation* **12**, 7 (2015).
79. Small, D. M. *et al.* Oxidative stress-induced alterations in PPAR- and associated mitochondrial destabilization contribute to kidney cell apoptosis. *AJP: Renal Physiology* **307**, F814–F822 (2014).
80. Tan, J.-L. *et al.* Mild Oxidative Stress Induces Redistribution of BACE1 in Non-Apoptotic Conditions and Promotes the Amyloidogenic Processing of Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein. *PLoS One* **8**, e61246 (2013).
81. Miranda, S. *et al.* The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid β -peptide in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **62**, 633–648 (2000).
82. Luca, M., Maria, L., Antonina, L. & Carmela, C. The Role of Oxidative Damage in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 1–8 (2015).
83. Mangialasche, F. *et al.* Tocopherols and tocotrienols plasma levels are associated with cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* **33**, 2282–2290 (2012).
84. Rinaldi, P. *et al.* Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **24**,

- 915–919 (2003).
85. Chang, Y.-T. *et al.* The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–14 (2014).
86. Marcourakis, T. *et al.* Oxidative Stress Peripheral Biomarkers in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Alzheimers. Dement.* **6**, e12 (2010).
87. Sayre, L. M. *et al.* In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J. Neurochem.* **74**, 270–279 (2000).
88. Lee, J.-Y., Cole, T. B., Palmiter, R. D., Suh, S. W. & Koh, J.-Y. Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7705–7710 (2002).
89. Smith, M. A., Harris, P. L., Sayre, L. M. & Perry, G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9866–9868 (1997).
90. Huang, X. *et al.* Zinc-induced Alzheimer's A 1-40 Aggregation Is Mediated by Conformational Factors. *J. Biol. Chem.* **272**, 26464–26470 (1997).
91. Atwood, C. S. *et al.* Dramatic Aggregation of Alzheimer A by Cu(II) Is Induced by Conditions Representing Physiological Acidosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 12817–12826 (1998).
92. Terry, R. D. The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 1023–1025 (1996).
93. Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L. & Markesbery, W. R. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile

- plaques. *J. Neurol. Sci.* **158**, 47–52 (1998).
94. Basun, H., Forsell, L. G., Wetterberg, L. & Winblad, B. Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* **3**, 231–258 (1991).
95. Squitti, R. *et al.* Elevation of serum copper levels discriminates Alzheimer's disease from vascular dementia. *Neurology* **60**, 2013–2014 (2003).
96. Skoumalová, A. & Hort, J. Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2291–2300 (2012).
97. Choi, S.-H. *et al.* Cyclooxygenase-1 inhibition reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **124**, 59–68 (2012).
98. Montine, T. J. *et al.* Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD. *Neurology* **53**, 1495–1498 (1999).
99. Liu, J. J., Green, P., John Mann, J., Rapoport, S. I. & Sublette, M. E. Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: implications for brain function in neuropsychiatric health and disease. *Brain Res.* **1597**, 220–246 (2015).
100. Cooper, R. E., Tye, C., Kuntsi, J., Vassos, E. & Asherson, P. The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on emotional dysregulation, oppositional behaviour and conduct problems in ADHD: A systematic review and meta-analysis. *J. Affect. Disord.* **190**, 474–482 (2016).
101. Rapoport, S. I., Rao, J. S. & Igarashi, M. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **77**, 251–261 (2007).

102. Schönfeld, P. & Reiser, G. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 1493–1499 (2013).
103. Speijer, D. Oxygen radicals shaping evolution: why fatty acid catabolism leads to peroxisomes while neurons do without it: FADH₂/NADH flux ratios determining mitochondrial radical formation were crucial for the eukaryotic invention of peroxisomes and catabolic tissue differentiation. *Bioessays* **33**, 88–94 (2011).
104. Chen, C. T. *et al.* Inhibiting mitochondrial β -oxidation selectively reduces levels of nonenzymatic oxidative polyunsaturated fatty acid metabolites in the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, 376–379 (2013).
105. Green, J. T., Orr, S. K. & Bazinet, R. P. The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A2 in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids. *J. Lipid Res.* **49**, 939–944 (2008).
106. Purdon, A. D., Rosenberger, T. A., Shetty, H. U. & Rapoport, S. I. Energy consumption by phospholipid metabolism in mammalian brain. *Neurochem. Res.* **27**, 1641–1647 (2002).
107. Bosetti, F. Arachidonic acid metabolism in brain physiology and pathology: lessons from genetically altered mouse models. *J. Neurochem.* **102**, 577–586 (2007).
108. Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 81–128 (1991).
109. Montuschi, P., Paolo, M., Peter, B. & Jackson Roberts, L. Insights into Oxidative Stress: The Isoprostanes. *Curr. Med. Chem.* **14**, 703–717



- (2007).
110. Pryor, W. A. & Stanley, J. P. Suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J. Org. Chem.* **40**, 3615–3617 (1975).
111. Willson, R. L. Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo? *Ciba Found. Symp.* 19–42 (1978).
112. Frankel, E. N., Neff, W. E., Brooks, D. D. & Fujimoto, K. Fluorescence formation from the interaction of DNA with lipid oxidation degradation products. *Biochim. Biophys. Acta* **919**, 239–244 (1987).
113. Meagher, E. A. & FitzGerald, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1745–1750 (2000).
114. Radak, Z., Zsolt, R., Zhongfu, Z., Sataro, G. & Erika, K. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol. Aspects Med.* **32**, 305–315 (2011).
115. Anzai, K. *et al.* Oxidation-dependent changes in the stability and permeability of lipid bilayers. *Antioxid. Redox Signal.* **1**, 339–347 (1999).
116. Yehuda, S., Rabinovitz, S., Carasso, R. L. & Mostofsky, D. I. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol. Aging* **23**, 843–853 (2002).
117. Farooqui, A. A. & Horrocks, L. A. Lipid peroxides in the free radical pathophysiology of brain diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.* **18**, 599–608 (1998).
118. Butterfield, D. A. *et al.* Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neurosci. Lett.* **397**, 170–173 (2006).

119. Butterfield, D. A. *et al.* Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **22**, 223–232 (2006).
120. Montine, T. J. *et al.* Increased CSF F2-isoprostane concentration in probable AD. *Neurology* **52**, 562–562 (1999).
121. Reed, T. T., Pierce, W. M., Markesbery, W. R. & Butterfield, D. A. Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Res.* **1274**, 66–76 (2009).
122. Hayn, M. *et al.* Evidence against the involvement of reactive oxygen species in the pathogenesis of neuronal death in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Life Sci.* **59**, 537–544 (1996).
123. Lyras, L., Cairns, N. J., Jenner, A., Jenner, P. & Halliwell, B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **68**, 2061–2069 (1997).
124. Ramassamy, C. *et al.* Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.* **7**, 23–37 (2000).
125. Aybek, H., Ercan, F., Aslan, D. & Sahiner, T. Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey. *Clin. Biochem.* **40**, 172–176 (2007).
126. Montine, K. S. *et al.* Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in Alzheimer's disease is associated with inheritance of APOE4. *Am. J. Pathol.* **150**, 437–443 (1997).

127. Sayre, L. M., Zagorski, M. G., Surewicz, W. K., Krafft, G. A. & Perry, G. Mechanisms of neurotoxicity associated with amyloid beta deposition and the role of free radicals in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 518–526 (1997).
128. Markesbery, W. R. & Lovell, M. A. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **19**, 33–36 (1998).
129. Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M. & Markesbery, W. R. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* **45**, 1594–1601 (1995).
130. Marcus, D. L. *et al.* Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* **150**, 40–44 (1998).
131. Smith, C. D. *et al.* Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10540–10543 (1991).
132. Balazs, L. & Leon, M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem. Res.* **19**, 1131–1137 (1994).
133. Sultana, R., Perluigi, M. & Butterfield, D. A. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 2021–2037 (2006).
134. Onaran, I., Yalçın, A. S. & Sultuybek, G. Effect of donor age on the susceptibility of erythrocytes and erythrocyte membranes to cumene hydroperoxide-induced oxidative stress. *Mech. Ageing Dev.* **98**, 127–138 (1997).

135. Glass, G. A. & Gershon, D. Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging. *Biochem. J* **218**, 531–537 (1984).
136. Jozwiak, Z., Zofia, J. & Barbara, J. Changes in oxygen-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in human erythrocytes as a function of age of donor. *Mech. Ageing Dev.* **32**, 77–83 (1985).
137. García-Arumí, E., Andreu, A. L., López-Hellín, J. & Schwartz, S. Effect of oxidative stress on lymphocytes from elderly subjects. *Clin. Sci.* **94**, 447–452 (1998).
138. Polidori, M. C. & Mecocci, P. Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease. *J. Alzheimers. Dis.* **4**, 517–522 (2002).
139. Galbusera, C. *et al.* Increased susceptibility to plasma lipid peroxidation in Alzheimer disease patients. *Curr. Alzheimer Res.* **1**, 103–109 (2004).
140. Leutner, S. *et al.* Enhanced ROS-generation in lymphocytes from Alzheimer's patients. *Pharmacopsychiatry* **38**, 312–315 (2005).
141. Hajimohammadreza, I. & Brammer, M. Brain membrane fluidity and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **112**, 333–337 (1990).
142. Baldeiras, I. *et al.* Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **15**, 117–128 (2008).
143. Torres, L. L. *et al.* Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **26**, 59–68 (2011).
144. Casado, A., Encarnación López-Fernández, M., Concepción Casado, M. & de La Torre, R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in

- vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem. Res.* **33**, 450–458 (2008).
145. Serra, J. A. *et al.* 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**, 1135–1148 (2001).
146. Padurariu, M. *et al.* Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **469**, 6–10 (2010).
147. Kawamoto, E. M. *et al.* Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **26**, 857–864 (2005).
148. Martín-Aragón, S. *et al.* Metalloproteinase's activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **34**, 373–378 (2009).
149. Guidi, I. *et al.* Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **27**, 262–269 (2006).
150. Bourdel-Marchasson, I. *et al.* Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing* **30**, 235–241 (2001).
151. Zafrilla, P. *et al.* Oxidative Stress in Alzheimer Patients in Different Stages of the Disease. *Curr. Med. Chem.* **13**, 1075–1083 (2006).
152. Praticò, D. *et al.* Increased 8,12-iso-iPF2alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann. Neurol.* **48**, 809–812 (2000).
153. Praticò, D. *et al.* Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **59**,



Disseminato e firmato digitalmente da Francesco Maria Serino

- 972–976 (2002).
154. de Leon, M. J. *et al.* Longitudinal CSF isoprostane and MRI atrophy in the progression to AD. *J. Neurol.* **254**, 1666–1675 (2007).
155. Ceballos, I. *et al.* in *Advances in Experimental Medicine and Biology* 493–498 (1990).
156. Ahlskog, J. E. *et al.* No evidence for systemic oxidant stress in Parkinson's or Alzheimer's disease. *Mov. Disord.* **10**, 566–573 (1995).
157. McGrath, L. T. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *QJM* **94**, 485–490 (2001).
158. Montine, T. J. *et al.* Peripheral F2-isoprostanes and F4-neuroprostanes are not increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **52**, 175–179 (2002).
159. Irizarry, M. C., Yao, Y., Hyman, B. T., Growdon, J. H. & Praticò, D. Plasma F2A isoprostane levels in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurodegener. Dis.* **4**, 403–405 (2007).
160. Greilberger, J. *et al.* Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic. Res.* **42**, 633–638 (2008).
161. Migliore, L. *et al.* Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiol. Aging* **26**, 567–573 (2005).
162. Markesbery, W. R., Kryscio, R. J., Lovell, M. A. & Morrow, J. D. Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* **58**, 730–735 (2005).
163. Williams, T. I., Lynn, B. C., Markesbery, W. R. & Lovell, M. A. Increased

- levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **27**, 1094–1099 (2006).
164. Keller, J. N. *et al.* Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* **64**, 1152–1156 (2005).
165. Sultana, R., Perluigi, M. & Butterfield, D. A. Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Abeta in pathogenesis. *Acta Neuropathol.* **118**, 131–150 (2009).
166. Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M. & Drake, J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol. Aging* **23**, 655–664 (2002).
167. Butterfield, D. A., Allan Butterfield, D., Tanea, R., Newman, S. F. & Rukhsana, S. Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine* **43**, 658–677 (2007).
168. Gouras, G. K. *et al.* Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* **156**, 15–20 (2000).
169. Persidsky, Y., Yuri, P., Ramirez, S. H., James, H. & Kanmogne, G. D. Blood–brain Barrier: Structural Components and Function Under Physiologic and Pathologic Conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **1**, 223–236 (2006).
170. Beckman, J. S., Ye, Y. Z., Chen, J. & Conger, K. A. The interactions of nitric oxide with oxygen radicals and scavengers in cerebral ischemic

- injury. *Adv. Neurol.* **71**, 339–50; discussion 350–4 (1996).
171. Kontos, H. A. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke* **32**, 2712–2716 (2001).
172. Haorah, J. *et al.* Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J. Neurochem.* **101**, 566–576 (2007).
173. Bowman, G. L. *et al.* Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance. *Neurology* **68**, 1809–1814 (2007).
174. Lucantoni, G. *et al.* The red blood cell as a biosensor for monitoring oxidative imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo and in vitro study. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1171–1182 (2006).
175. Minetti, M. & Malorni, W. Redox control of red blood cell biology: the red blood cell as a target and source of prooxidant species. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1165–1169 (2006).
176. Minetti, M., M, M., L, A. & W, M. The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behavior: Pathogenetic implications for vascular diseases. *Cardiovasc. Res.* **75**, 21–28 (2007).
177. Carver, J. D., Benford, V. J., Han, B. & Cantor, A. B. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. *Brain Res. Bull.* **56**, 79–85 (2001).
178. McKhann, G. *et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**, 939–944 (1984).
179. Albert, M. S. *et al.* The diagnosis of mild cognitive impairment due to



- Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement.* **7**, 270–279 (2011).
180. Folstein, M. F., Folstein, S. E. & McHugh, P. R. 'Mini-mental state'. *J. Psychiatr. Res.* **12**, 189–198 (1975).
181. {Snalina, N. *et al.* Memantine changes lipids spectrum and lipid peroxidation in animal brain and plasma of patients with Alzheimer's disease. *FEBS J.* **281**, 86 (2014).
182. Kelley, N. S., Yasukazu, Y. & Erickson, K. L. Do n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Increase or Decrease Lipid Peroxidation in Humans? *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **12**, 403–415 (2014).
183. Balazs, L., Louisa, B. & Michael, L. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem. Res.* **19**, 1131–1137 (1994).
184. Goux, W. J., Santiago, R. & Sparkman, D. R. Analysis of the core components of Alzheimer paired helical filaments A gas chromatography/mass spectrometry characterization of fatty acids, carbohydrates and long-chain bases. *FEBS Lett.* **366**, 81–85 (1995).
185. Patil, S., Sheng, L., Masserang, A. & Chan, C. Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neurosci. Lett.* **406**, 55–59 (2006).
186. Horrobin, D. F. Loss of delta-6-desaturase activity as a key factor in aging. *Med. Hypotheses* **7**, 1211–1220 (1981).
187. Nakada, T., Kwee, I. L. & Ellis, W. G. Membrane fatty acid composition shows delta-6-desaturase abnormalities in Alzheimer's disease. *Neuroreport* **1**, 153–155 (1990).

188. Boudrault, C., Bazinet, R. P. & Ma, D. W. L. Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* **20**, 1–10 (2009).
189. Stephenson, D. T., Lemere, C. A., Selkoe, D. J. & Clemens, J. A. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) immunoreactivity is elevated in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.* **3**, 51–63 (1996).
190. Kriem, B. *et al.* Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide. *FASEB J.* **19**, 85–87 (2005).
191. Sanchez-Mejia, R. O. *et al.* Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **11**, 1311–1318 (2008).
192. Sanchez-Mejia, R. O. & Lennart, M. Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1801**, 784–790 (2010).