

Stefano Govoni, Claudio Pelosi, Marco Racchi

Dipartimento di Farmacologia Sperimentale e Applicata, Università di Pavia

Stress ossidativo, demenza e invecchiamento: i confini incerti di un continuum biologico di difficile valutazione

Oggi si sta dedicando sempre maggiore attenzione alla comprensione del processo di invecchiamento. In questo senso, qualsiasi ipotesi causale dovrebbe essere in grado di spiegare perché l'organismo va incontro a progressive e irreversibili modificazioni fisiologiche e perché esiste diversità nella durata media della vita tra le diverse specie. L'individuazione delle basi biologiche dell'invecchiamento potrebbe inoltre aiutare a comprendere le patologie involutive e degenerative che si possono manifestare in età avanzata a carico di diversi organi e apparati. In questo contesto assumono particolare importanza per la frequenza e per il carico di disabilità che comportano i processi neurodegenerativi dell'encefalo. L'espressione delle alterazioni e del danno varia da modificazioni modeste delle principali funzioni neurotrasmettitoriali e metaboliche che portano a compromissione della funzionalità neuronale fino a modificazioni morfologiche micro- e macroscopiche della struttura stessa dell'encefalo.

I precisi meccanismi molecolari che stanno alla base di tali processi non sono noti e soprattutto non è nota la loro sequenza temporale, la gerarchia e la soglia tra fisiologia e patologia. Da qui l'incertezza sull'eziopatogenesi dei processi neurodegenerativi che deve essere considerata eterogenea e multifattoriale. Tutto questo ha portato a formulare diverse ipotesi di lavoro dirette su più fronti non sempre ricomposte in un quadro d'insieme e spesso trasversali a più patologie. La domanda di fondo è rivolta a sapere se i meccanismi di neurodegenerazione che vengono di volta in volta individuati siano specifici per una patologia (malattia di Parkinson, malattia di Alzheimer, forme vascolari) o comuni a più di esse.

Una di queste ipotesi, trasversale all'invecchiamento e a più stati patologici, associa l'accumulo di danno ossidativo con la perdita di funzionalità. Dal punto di vista molecolare, l'aumento di stress ossidativo associato all'età può essere

ricondotto a tre diversi fattori: un aumento della velocità con cui vengono prodotti metaboliti reattivi dell'ossigeno, un declino dei sistemi antiossidanti di difesa e una diminuita efficienza nel degradare e riparare molecole danneggiate. Altri studi hanno inoltre suggerito che possano contribuire difetti nel metabolismo energetico e fenomeni di eccitotossicità. Non è irragionevole pensare all'esistenza di interazioni tra tutti questi meccanismi. Ad esempio: un difetto nel metabolismo energetico causato dall'azione di alcuni radicali può portare a depolarizzazione neuronale, rilascio di glutammato, attivazione di recettori eccitatori e accumulo intracellulare di calcio, dando origine a un circolo che si autosostiene e produce degenerazione. Il problema sta nel capire se tali interazioni, dimostrabili in sistemi sperimentali, hanno luogo anche *in vivo*, se sono parallele o in cascata e a che livello diventano irreversibili. La lunga serie di delusioni quando si è cercato di passare dalla teoria all'applicazione nel campo degli studi sui processi degenerativi conseguenti a ischemia cerebrale è emblematica di questo stato di fatto. È stata prodotta una letteratura di base ricchissima e di grande valore in termini di informazione sui meccanismi, ma l'imprecisa conoscenza della collocazione temporale e gerarchica degli stessi *in vivo* ha precluso ogni successo degli sviluppi applicativi. La teoria sull'importanza dello stress ossidativo nei processi di invecchiamento fisiologico merita comunque attenzione sia perché gode di una certa popolarità, anche nei media, sia perché sono stati pubblicati su *referred journals* alcuni articoli relativi a principi antiossidanti (vitamina E, selegelina, Ginkgo) utilizzati nella malattia di Alzheimer e in altre condizioni con risultati modesti, ma statisticamente significativi. Di seguito vengono riportati alcuni degli aspetti teorici relativi a questo settore.

RADICALI LIBERI

I radicali liberi sono specie chimiche con un elettrone spaiato nel loro orbitale più esterno e sono caratterizzati dal possedere un'elevata reattività e instabilità chimica. Molto importanti dal punto di vista biologico risultano essere le specie radicaliche dell'ossigeno e dell'azoto come ad esempio l'anione superossido O_2^- , il radicale idrossilico $OH\cdot$, l'ossido di azoto $NO\cdot$ e l'anione perossinitrito $ONOO^-$ che può derivare dalla combinazione dei radicali O_2^- e $NO\cdot$. Tra le specie dell'ossigeno citate quella più attiva è il radicale $OH\cdot$ che reagisce a pochi angstrom dal punto in cui viene prodotto e la cui formazione può essere catalizzata da alcuni metalli di transizione a partire da H_2O^2 . H_2O^2 può originare a sua volta dal radicale O_2^- in seguito all'azione dell'enzima superossido dismutasi (SOD). Nonostante vi siano numerose sedi di formazione dei radicali liberi all'interno della cellula, sembra che i mitocondri ne siano la fonte principale. Il radicale superossido viene prodotto soprattutto a livello dell'ubichinone e dell'enzima NADH deidrogenasi, cioè i punti della catena respiratoria in cui gli elettroni sono trasferiti uno per uno a formare l'ubisemichinone che può reagire con l'ossigeno e dare O_2^- .⁽¹⁾

Si è detto che i radicali liberi sono specie estremamente reattive e, una volta formati, possono iniziare una serie di reazioni nocive per la cellula. I principali danni avvengono per interazione con macromolecole fondamentali alla sopravvivenza cellulare quali DNA, proteine e acidi grassi. I radicali liberi che interagiscono con il materiale genetico cellulare sono soprattutto $OH\cdot$ e $ONOO^-$ ⁽²⁾ in grado di attaccare facilmente i siti elettronricchi del DNA danneggiandoli⁽³⁾ e portando ad alterazioni genetiche. I radicali possono inoltre reagire facilmente con gli acidi grassi polinsaturi che costituiscono la membrana cellulare e di cui è particolarmente ricco il tessuto cerebrale. Quando la membrana cellulare va incontro a perossidazione lipidica viene liberata una serie di aldeidi come la malondialdeide (MDA), l'esanale e la 4-idrossinonenale (HNE)⁽⁴⁾. Studi sperimentali su cellule in coltura hanno dimostrato che la HNE è in grado di formare legami crociati tra le proteine del citoscheletro⁽⁵⁾, di instaurare legami covalenti con residui di cisteina, lisina e istidina⁽⁶⁾ e di produrre danno fino alla morte cellulare in colture primarie di cellule di ippocampo⁽⁷⁾. Accanto al-

la tossicità di tali sostanze va comunque considerato che il danno arrecato all'integrità della membrana cellulare determina esso stesso uno squilibrio ionico con conseguenze a livello dell'omeostasi del Ca^{2+} , situazione nociva per la funzionalità cellulare.

È opportuno sottolineare che, anche in condizioni fisiologiche, vi è produzione di radicali liberi (i mitocondri isolati producono circa 0,6-1,0 nmol di H_2O_2 min^{-1} per mg di proteina). Tale fenomeno è controbilanciato da sistemi cellulari di natura enzimatica e da antiossidanti di origine endogena. Il profondo danno causato dai radicali assume notevole importanza quando è presente uno squilibrio tra la produzione degli stessi e i sistemi in grado di neutralizzarli. Ricordiamo infatti che a livello cellulare la maggior parte dell'anione superossido O_2^- viene convertita dall'enzima superossido dismutasi a H_2O_2 . Questo perossido, unitamente ad altri idroperossidi, può venire rimosso grazie a due enzimi: la catalasi (CAT) e la glutatione perossidasi (GPx). La CAT converte H_2O_2 a H_2O mentre la GPx ossida il glutatione (GSH) nella sua forma disolfurica (GSSG) utilizzando come substrato H_2O_2 e gli altri perossidi. GSSG può essere poi riconvertito a GSH in presenza di glutatione reduttasi che utilizza come cofattore NADPH. Il bilancio netto di questa serie di reazioni è una "neutralizzazione" del radicale superossido.

STRESS OSSIDATIVO E DIMINUZIONE DELL'ATTIVITÀ MITOCONDRIALE

Studi sperimentali hanno dimostrato nell'invecchiamento una diminuzione dell'attività dei mitocondri associata a un aumento del danno al DNA mitocondriale. In particolare, risultati su tessuti cerebrali di primati hanno evidenziato un significativo decremento nell'attività dei complessi I e IV della catena respiratoria^(8,9) con conseguente alterazione nella produzione di adenosina trifosfato (ATP). È stato inoltre osservato che anche diverse mutazioni puntiformi del DNA mitocondriale sono da ricondurre al processo di invecchiamento a cui si aggiunge l'intervento di specie radicaliche. Un utile parametro per la valutazione dell'aumento di danno ossidativo al DNA mitocondriale è rappresentato dalla misura della 8-idrossi-2-deossiguanosina, forma ossidata della deossiguanosina. Con l'invecchiamento au-

menta il contenuto di questa base nucleotidica modificata nel DNA mitocondriale estratto da tessuto cerebrale umano ⁽¹⁰⁾.

Alcuni gruppi di lavoro hanno dimostrato che modificazioni della funzionalità mitocondriale possono essere messe in relazione anche con le principali patologie neurodegenerative. Nei soggetti affetti da malattia di Alzheimer (AD) si è misurata una diminuzione del 25-30% dell'attività della citocromo ossidasi in diverse regioni cerebrali ⁽¹¹⁾; un calo del 50% è stato invece riscontrato in mitocondri purificati da tessuto cerebrale di pazienti AD. In questi studi non è stata rilevata alcuna modificazione nella concentrazione di citocromo *aa3* (componente della citocromo ossidasi) e ciò porta a ritenere che si verifichi una diminuzione dell'attività catalitica dell'enzima più che una riduzione della concentrazione dell'enzima stesso ⁽¹²⁾. È interessante notare che la riduzione dell'attività della citocromo ossidasi è stata osservata anche in cellule di origine periferica, quali i fibroblasti, preparate da pazienti affetti da AD (13). In queste ultime cellule le alterazioni del metabolismo ossidativo compromettono il controllo del *processing* del precursore di β -amiloide che è deviato verso le forme amiloidogeniche ⁽¹⁴⁾.

ECCITOTOSSICITÀ

Il termine "eccitotossicità" indica morte cellulare causata da iperstimolazione dei recettori per gli aminoacidi eccitatori. Tale fenomeno può essere connesso a difetti nel metabolismo energetico ⁽¹⁵⁾. L'incapacità di mantenere stabili i livelli di ATP cellulare può portare a parziale depolarizzazione neuronale con conseguente perdita del blocco dei recettori NMDA da parte del Mg^{2+} . Ciò determina una persistente attivazione da parte del glutammato che si ripercuote negativamente sul mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} . Il gradiente di Ca^{2+} tra il compartimento extracellulare e quello intracellulare viene mantenuto costante grazie all'azione della pompa Ca^{2+} -ATPasi e della pompa a scambio ionico Na^+/Ca^{2+} . Il Ca^{2+} viene poi sequestrato dal compartimento citoplasmatico e accumulato nel reticolo endoplasmatico (RE) e nei mitocondri oppure viene legato a proteine specifiche. La riduzione del metabolismo energetico e l'azione eccitatoria di neurotrasmettitori (glutammato) possono indurre un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} . Gli au-

mentati livelli di Ca^{2+} sono in grado di innescare una serie di processi nocivi per la cellula nervosa quali l'attivazione di enzimi come le fosfolipasi, le proteasi, le endonucleasi e la NO-sintasi. Il calcio stimola anche la produzione di radicali liberi, dando così origine a un circolo autosostenentesi.

STRESS OSSIDATIVO E MALATTIA DI ALZHEIMER

Dando per accettato il coinvolgimento di specie radicaliche nel processo di invecchiamento, come sopra indicato, e considerando che esiste una stretta associazione tra quest'ultimo e la malattia di Alzheimer, diversi gruppi hanno indirizzato la loro attenzione alla comprensione del ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi dell'AD. Questa ipotesi è supportata dal fatto che il cervello è un organo particolarmente suscettibile al danno ossidativo. Il metabolismo cerebrale richiede elevati livelli energetici ed è strettamente dipendente dalle condizioni aerobiche; esso è inoltre particolarmente ricco di acidi grassi polinsaturi, facilmente ossidabili, e di metalli di transizione, che possono favorire la formazione del radicale OH \cdot . Il cervello è caratterizzato infine da un minore contenuto di sistemi antiossidanti, se paragonato ad altri organi ⁽¹⁶⁾. Un eccesso di attività proossidanti o la caduta di meccanismi antiossidanti di difesa legati alla patologia potrebbero quindi far superare facilmente la soglia oltre la quale il danno neurodegenerativo diventerebbe importante. In alternativa, le alterazioni del metabolismo ossidativo presenti nell'età avanzata potrebbero rendere il cervello più suscettibile al danno da peptidi neurotossici come β -amiloide in forma solubile o fibrillare.

MARKER DI DANNO OSSIDATIVO NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER

Studi su tessuto cerebrale *postmortem* di pazienti AD hanno mostrato un notevole incremento di marker tipici del danno ossidativo di seguito riassunti.

Perossidazione lipidica. I livelli di perossidazione lipidica, determinati mediante l'analisi delle sostanze reattive per l'acido tiobarbiturico (TBARS), quali la MDA, risultano essere aumentati in diverse regioni cerebrali, tra cui la corteccia

frontale e temporale ⁽¹⁷⁾. Altro indice della perossidazione lipidica è rappresentato dalla HNE: i livelli della forma libera di questa aldeide risultano elevati in diverse aree del cervello AD e nel liquor ventricolare ⁽¹⁸⁾.

Ossidazione delle proteine. Le specie reattive dell'ossigeno possono interagire con residui aminoacidici (in particolare istidina, arginina e lisina) formando funzioni carboniliche. La valutazione del contenuto di carbonilproteine costituisce quindi un ulteriore indice utile per l'identificazione del danno ossidativo nei tessuti. Smith e altri ⁽¹⁹⁾ hanno rilevato che i livelli cerebrali di questi composti aumentano con l'invecchiamento senza tuttavia notare una significativa differenza tra i tessuti provenienti da soggetti anziani e tessuti di pazienti AD. Studi successivi ⁽²⁰⁾, tuttavia, indicherebbero una maggior presenza di carbonilproteine nell'ippocampo e nel lobulo parietale inferiore del cervello AD.

Glicoossidazione. I monosaccaridi possono indurre una modificazione irreversibile delle proteine mediante due distinti meccanismi. Il primo consiste nella formazione di radicali liberi in presenza di metalli di transizione e ciò potrebbe originare gruppi carbonilici reattivi. Il secondo prevede il coinvolgimento di una glicazione non enzimatica che si traduce nella formazione di composti stabili noti come composti finali di glicazione o AGE. Recentemente, maggiore attenzione è stata posta sul fenomeno della modificazione delle proteine da parte dei composti AGE. Tali proteine modificate sembrerebbero in grado di legarsi a recettori specifici presenti in diverse linee cellulari con conseguente aumento della produzione di specie radicaliche dell'ossigeno. Usando anticorpi specifici Yan e altri ⁽²¹⁾ hanno colocalizzato questi composti con la proteina τ iperfosforilata nei gomitoli neurofibrillari presenti nel cervello AD. Studi successivi ne hanno dimostrato la presenza anche nelle placche neuritiche ⁽²²⁾ e ciò suggerisce che l'eccessiva glicoossidazione delle proteine potrebbe essere un evento precoce della degenerazione cellulare.

Sistemi enzimatici antiossidanti. Un ultimo contributo alla valutazione del danno ossidativo deriva dalla constatazione che nella malattia di Alzheimer si hanno alterati livelli dei sistemi enzimatici antiossidanti. A tale proposito uno stu-

dio ha dimostrato una sensibile riduzione dell'enzima catalasi a livello dell'ippocampo e del cervelletto e un aumento parallelo dell'enzima Mn-superossido dismutasi ⁽²³⁾. I risultati esposti non concordano tuttavia con una ricerca precedente in cui si dimostrava, nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale, una riduzione della superossido dismutasi pari al 25-35% ⁽²⁴⁾. Nonostante vi sia discordanza sui dati ottenuti, va comunque sottolineato che in entrambi i casi si giunge alla ulteriore dimostrazione che nei soggetti AD vi è un aumento del danno ossidativo. La carenza di catalasi e l'incremento dell'enzima superossido dismutasi causano un accumulo di H_2O_2 . Da un lato ne viene infatti ridotta la degradazione e dall'altro ne viene aumentata la produzione a partire dall'anione O_2^- . In presenza di metalli di transizione, H_2O_2 origina il radicale $OH\cdot$, molto tossico e non eliminabile per via enzimatica. La riduzione dell'attività della SOD causa invece un aumento di O_2^- che non essendo convertito a H_2O_2 rappresenta esso stesso l'agente tossico.

B-AMILOIDE E MECCANISMI DI DANNO OSSIDATIVO

La scoperta di B-amiloide (AB) quale componente principale delle placche senili ha dato avvio a numerose ricerche, mirate a definirne con esattezza il ruolo nello sviluppo della malattia. Accertato che il peptide svolge un ruolo attivo nell'eziopatogenesi dell'AD, gli studi attuali sono indirizzati a evidenziare i meccanismi cellulari conseguenti alla deposizione di AB.

AB è fisiologicamente prodotto dalle cellule neuronali ed è presente in piccole concentrazioni nel liquor; nella malattia di Alzheimer esso forma aggregati fibrillari insolubili che si depositano nel parenchima di diverse regioni cerebrali provocando degenerazione neuronale.

L'azione tossica di AB sarebbe da attribuire alla sua forma fibrillare e non alla sua forma solubile, suggerendo che sia il processo fisico-chimico coinvolto nella formazione delle fibrille o la struttura fibrillare a promuovere tale degenerazione ⁽²⁵⁾. Studi *in vitro* evidenziano come le proprietà neurotossiche di AB possano essere mediate da alcune specie radicaliche dell'ossigeno. Le cellule esposte al peptide mostrano elevati livelli di H_2O_2 che, come si è detto in

precedenza, può originare il radicale $\text{OH}\cdot$ ⁽²⁶⁾. Questi risultati nascono dall'osservazione che l'aggiunta di catalasi al *medium* di crescita cellulare protegge dall'azione tossica di AB. Studi successivi hanno tuttavia dimostrato che, sebbene la catalasi sia capace di attenuare la tossicità del peptide, tale aggiunta non è in grado di ridurre gli aumenti dei livelli di H_2O_2 , segno che questo non è il mediatore della tossicità di AB ⁽²⁷⁾.

Un secondo meccanismo prevede che AB si possa legare ai recettori per i prodotti finali di glicazione (RAGE), inducendo in questo modo la produzione di specie reattive dell'ossigeno ⁽²⁸⁾, anche se studi recenti ipotizzano il coinvolgimento di altre proteine in grado di legare AB ⁽²⁹⁾.

Nonostante non vi sia ancora chiarezza sull'effettivo contributo di ciascuna delle fonti di radicali liberi, è comunque in generale accertato che AB causa ossidazione di componenti essenziali alla corretta funzionalità cellulare come le membrane, i mitocondri e il DNA nucleare.

La perossidazione lipidica membranale indotta da AB altera l'attività di proteine quali le pompe ioniche Na^+/K^+ -ATPasi e Ca^{2+} -ATPasi con conseguente alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} . Questo fenomeno sembra sia mediato dalla HNE, che è uno dei prodotti della reazione di perossidazione dei lipidi. HNE è infatti in grado di interferire direttamente con la Na^+/K^+ -ATPasi e di aumentare la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , rendendo in questo modo le cellule neuronali maggiormente suscettibili a eccitotossicità. I dati forniti da Shearman e altri ⁽³⁰⁾ indicano inoltre che AB causa alterazioni a livello della funzionalità mitocondriale inducendo una riduzione della produzione di ATP. Tale difetto del metabolismo energetico si ripercuote poi direttamente sullo scambio ionico promosso dalle pompe ATP-dipendenti.

Uno studio del 1989 dimostrò che nelle cellule cerebrali di soggetti AD vi è una ridotta capacità di assimilazione del glucosio ⁽³¹⁾. Esperimenti *in vitro* hanno evidenziato che AB è in grado di interferire con i sistemi di trasporto del glucosio mediante un meccanismo dipendente dalla perossidazione lipidica ⁽³²⁾. La deplezione di ATP risulterebbe, quindi, una conseguenza dei difetti legati al metabolismo del glucosio e AB si inserirebbe in questo contesto come il fenomeno scatenante della serie di eventi tossici.

INTERVENTO ANTIOSSIDANTE?

È noto che un regime alimentare ipocalorico, adeguatamente integrato con elementi nutritivi essenziali, prolunga la durata media della vita negli animali da laboratorio. Considerando lo stress ossidativo come una delle principali cause dell'invecchiamento e delle patologie neurodegenerative ad esso connesse, il beneficio apportato dalla restrizione calorica andrebbe collegato a un abbassamento dei livelli di stress ossidativo e a un aumento del potenziale metabolico. I risultati sperimentali confermano tale ipotesi. Gli animali sottoposti ad alimentazione ipocalorica mostrano, infatti, un'attenuazione della produzione di O_2^- e H_2O_2 a livello mitocondriale ⁽³³⁾ e un minor accumulo di danno ossidativo. Allo stesso modo anche sostanze dotate di proprietà antiossidanti o in grado di potenziare i sistemi endogeni di difesa dai radicali liberi dovrebbero prevenire l'insorgenza di stati di demenza, inclusa la malattia di Alzheimer. Da tempo è stata descritta l'attività antiradicalica di sostanze quali il selenio, la vitamina C e la vitamina E. Alcuni studi su ratti anziani evidenziano come l'integrazione alimentare con vitamina E riesca a controbilanciare la diminuzione fisiologica dei livelli di GPx in relazione all'età, parificando le concentrazioni dell'enzima con quelle dei ratti giovani ⁽³⁴⁾.

Anche nell'uomo è stata evidenziata già da almeno due decenni una possibile correlazione tra fattori dietetici, invecchiamento cerebrale, disfunzioni cognitive e rischio di demenze. In particolare una dieta ricca di acidi grassi e una contemporanea carenza di sostanze antiossidanti potrebbero aggravare e potenziare il danno ossidativo ⁽³⁵⁾. Al contrario, una corretta integrazione alimentare con vitamina C, vitamina E, beta-carotene e polifenoli (tutte sostanze in grado di neutralizzare l'azione dei radicali liberi) porterebbe a un miglioramento delle capacità cognitive ⁽³⁶⁾. Inoltre, studi più recenti di intervento con antiossidanti nella malattia di Alzheimer ⁽³⁷⁻³⁹⁾, commentati in Mayeux e altri ⁽⁴⁰⁾, hanno prodotto risultati significativi anche se modesti. Il problema di questa letteratura rimane l'incertezza, nel caso dei dati sulla dieta, sul reale contenuto in antiossidanti. Studi recenti di chi scrive ⁽⁴¹⁾ dimostrano, ad esempio, la presenza di potenti antiossidanti in diversi vegetali, ma il processo di cottura potrebbe alterarne il contenuto. Inoltre, mentre è relativamente facile dimostrarne l'attività *in vitro*,

poco si sa su assorbimento, distribuzione ed efficacia *in vivo*. Relativamente agli studi di intervento condotti, si è in attesa di conferme in altri studi indipendenti.

Queste osservazioni portano a pensare che qualsiasi trattamento capace di ridurre o di rallentare il processo ossidativo si inserisce, in questo contesto, come un possibile approccio preventivo, più che terapeutico, al trattamento delle patologie neurodegenerative. Se si pensa che una dieta ricca in antiossidanti è probabilmente una dieta bilanciata (anche dal punto di vista calorico), variata, ricca in vegetali e fibre, potenzialmente utile anche nella prevenzione di malattie cardiovascolari, al di là degli specifici meccanismi e delle prove scientifiche di efficacia, costituisce un suggerimento di stile di vita sicuramente proponibile. Più cauto il giudizio sull'intervento farmacologico con antiossidanti, la cui opzione costituisce, per ora, una scelta individuale operata dal medico.

BIBLIOGRAFIA

- De Jong AMP, Albracht SPJ. Ubisemiquinones as obligatory intermediates in the electron transfer from NADH to ubiquinone. *Eur J Biochem* 1994; 222:975-982.
- Meneghini R, Martins EL. Hydrogen peroxide and DNA damage. In: DNA and free radicals. London: Ellis Harwood 1993, pp.84-93.
- Reiter RJ. Oxidative damage to nuclear DNA: amelioration by melatonin. *Neuroendocrinol Letters* 1999; 20:145-150.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 1991; 11:81-128.
- Montine TJ, Amarnath V, Martin ME, et al. 4-hydroxy-2-nonenal is cytotoxic and cross-links cytoskeletal proteins in P19 neuroglial cultures. *Am J Pathol* 1996; 148:89-93.
- Uchida K, Stadtman ER. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1993; 268:6388-6393.
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, et al. A role for 4-hydroxynonenal in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 1997; 68:255-264.
- Di Monte DA, Sandy MS, DeLanney LE, et al. Age-dependent changes in mitochondrial energy production in striatum and cerebellum of the monkey brain. *Neurodegeneration* 1993; 2:93-99.
- Bowling AC, Mutysia EM, Walker LC, et al. Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. *J Neurochem* 1993; 60:1964-1967.
- Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 1993; 34:609-616.
- Mutysia EM, Bowling AC, Beal MF. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1994; 63:2179-2184.
- Parker WD Jr, Parks J, Filley CM, et al. Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 1994; 44:1090-1096.
- Curti D, Rognoni F, Gasparini L, et al. Oxidative metabolism in cultured fibroblasts derived from sporadic Alzheimer's disease (AD) patients. *Neuroscience Letters* 1997; 236(1):13-16.
- Gasparini L, Benussi L, Bianchetti A, et al. Energy metabolism inhibition impairs amyloid precursor protein secretion from Alzheimer's fibroblasts. *Neuroscience Letters* 1999; 263(2-3):197-200.
- Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness? *Ann Neurol* 1992; 31:119-130.
- Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222:236-245.
- Subbarao KV, Richardson JS, Ang LC. Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation *in vitro*. *J Neurochem* 1990; 55:342-345.
- Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP, Markesbery WR. Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18:457-461.
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:10540-10543.
- Hensley K, Hall N, Subramaniam R, et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* 1995; 65:2146-2156.
- Yan SD, Chen X, Schmidt AM, et al. Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:7787-7791.
- Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, et al. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57:905-914.
- Mattson MP. Central role of oxyradicals in the mechanism of amyloid beta-peptide cytotoxicity. *Alzheimer Dis Rev* 1997; 2:1-14.
- Richardson SJ. Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1993; 695:73-76.
- Mattson MP. Untangling the pathophysiochemistry of beta-amyloid. *Nature Struct Biol* 1995; 2:926-928.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 1994; 77:817-827.
- Zhang Z, Rydel RE, Drzewiecki GJ, et al. Amyloid beta-mediated oxidative and metabolic stress in rat cortical neurons: no direct evidence for a role for H₂O₂ generation. *J Neurochem* 1996; 67:1595-1606.

28. Yan SD, Chen X, Fu J, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996; 382:685-691.
29. Yan SD, Shi Y, Zhu A, et al. Role of ERAB/L-3-hydroxyacylcoenzyme A dehydrogenase type II activity in Abeta-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 1999; 274:2145-2156.
30. Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL. Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:1470-1474.
31. Kalara RN, Harik SI. Reduced glucose transporter at the blood-brain barrier and in cerebral cortex in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1989; 53:1083-1088.
32. Mark RJ, Pang Z, Geddes JW, et al. Amyloid beta-peptide impairs glucose uptake in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci* 1997; 17:1046-1054.
33. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, et al. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defense in the mouse. *Mech Ageing Dev* 1994; 74:121-133.
34. Campisi A, Di Giacomo C, Russo A, et al. Antioxidant systems in rat lens as a function of age: effect of chronic administration of vitamin E and ascorbate. *Aging* 1999; 11:39-43.
35. Abalan F. Alzheimer's disease and malnutrition: a new etiological hypothesis. *Med Hypotheses* 1984; 15:385-393.
36. Goodwin JS, Goodwin JM. Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population. *JAMA* 1983; 249:2917-2940.
37. Le Bars PL, Katz MM, Berman N, et al. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. *JAMA* 1997; 278:1327-1332.
38. Weyer G, Babej-Dolle RM, Hadler D, et al. A controlled study of two doses of idebenone in the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* 1997; 36:73-82.
39. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1997; 336:1216-1222.
40. Mayeux R, Sano M. Drug therapy: treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1999; 341:1670-1679.
41. Govoni S, Masoero E, Daglia M, et al. Activity of stabilized vegetable extracts against oxidative stress and beta amyloid toxicity. *Neurobiol Aging* 2000; 21:S111.