



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

I FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE GERIATRICHE XXV CICLO

Tesi di dottorato

RUOLO DELLA NOX2 NELLE DEMENZE:  
NUOVE STRATEGIE DI NEUROPROTEZIONE

RELATORE:  
Chiar.mo Prof. Vincenzo Marigliano

DOTTORANDA:  
Dott.ssa Chiara Fossati

## INDICE

	Pag.
Introduzione	2
Le Demenze	7
NOX2, stress ossidativo e Demenza di Alzheimer	27
Materiali e Metodi	37
Risultati	41
Discussione e Conclusioni	45
Bibliografia	49

## **INTRODUZIONE**

Il progressivo invecchiamento della popolazione, che caratterizza il nostro come gli altri Paesi Occidentali, è il risultato di mutamenti demografici profondi e piuttosto rapidi.

Oggi rispetto al passato l'età media è aumentata ed è cresciuta la percentuale di ultrasessantacinquenni. Le curve di sopravvivenza della popolazione italiana indicano che l'80% degli uomini e il 90% delle donne supereranno l'età di 65 anni (1), con significative conseguenze in termini economici e socio-sanitari.

Il processo di invecchiamento che interessa la popolazione italiana ha avuto origine già nel corso del XX secolo, a seguito della conclusione del processo di Transizione Demografica che ha interessato tutte le popolazioni a sviluppo avanzato, e si è progressivamente acuito con il miglioramento delle condizioni sociali e igienico-sanitarie che ha determinato un allungamento della vita media. Abbiamo, infatti, assistito ad un incremento della speranza di vita, dove per speranza di vita si intende il numero di anni che al momento della nascita una persona può prevedere di vivere. Nel 2006 la speranza di vita alla nascita era di 78,4 anni per gli uomini e 83,9 anni per le donne (2), dato molto differente da quello del 1950 che si attestava intorno ai 66 anni. Ciò è dovuto principalmente a due motivi: una più bassa mortalità infantile e il grande progresso della Scienza Medica che è riuscita a trattare con successo numerose patologie acute e croniche causa di mortalità precoce.

A tale invecchiamento dall'alto si è aggiunto un invecchiamento dal basso, determinato dalla forte denatalità, che ha contribuito a squilibrare i rapporti tra i diversi gruppi di popolazione. Vi è stato, infatti, un decremento della fecondità; nel 1998, secondo dati ISTAT, il numero di nati per donna in età feconda è stato di 1,19, uno tra i più bassi registrati al mondo. Da qualche anno a questa parte, il tasso di fecondità è in lieve ripresa (numero di nati per donna in età feconda nel 2007= 1,37) (3).

Il processo di invecchiamento demografico ha dunque incrementato nella popolazione il contingente di anziani in termini sia assoluti che relativi. La componente anziana, che in percentuale rappresenta un indice di invecchiamento della popolazione, è passata da 8,2% nel 1951 a 18,7% nel 2001, valore che, come vedremo in seguito, si è ulteriormente accresciuto negli anni successivi. Parallelamente è diminuito il peso della componente adulta della popolazione e, ancor più marcatamente, quello della componente giovanile, pari al 26,1% del totale della popolazione italiana al censimento del 1951 e solo al 14,2% a quello del 2001.

Secondo i dati ISTAT, l'indice di vecchiaia – definito come il rapporto, in percentuale, tra la popolazione con più di 65 anni e quella fino a 14 anni di età – è salito dal 92,5 del 1991 al 141,7 del 2007 (3).

Tale andamento demografico comporta numerose conseguenze politiche, economiche e sociali soprattutto per i Paesi Industrializzati in cui il suddetto fenomeno risulta essere più accentuato. Uno tra i

numerosi problemi che i Paesi Occidentali si sono trovati a dover affrontare è quello di assistere e curare soggetti anziani affetti da patologie croniche, talora invalidanti, che richiedono un grosso investimento di risorse sociali e sanitarie. Secondo dati ISTAT, il 52% degli uomini e il 66% delle donne ultrasessantacinquenni dichiarano almeno due malattie croniche, il 44% e il 51% rispettivamente ne dichiara almeno tre (1). In complesso, nel nostro paese, sono circa 1.100.000 coloro che hanno difficoltà nella cura di se stessi per una o più funzioni basilari della sopravvivenza; questo tipo di problema emerge in particolare per gli anziani al di sopra dei 74 anni e per gli ultraottantenni. (4)

Tra le patologie croniche più drammatiche, ad incidenza crescente all'interno della popolazione geriatrica, annoveriamo le demenze.

L'indagine EURODEM ha riscontrato una prevalenza media delle demenze nella popolazione ultrasessantacinquenne, in Europa, che varia, a seconda delle classi di età, dal 5.9 al 9.4%. (5). Per quanto riguarda l'Italia, uno degli studi più importanti degli ultimi anni, lo Studio ILSA (Italian Longitudinal Study on Aging) (6) ha mostrato una prevalenza media delle demenze negli ultrasessantacinquenni del 6.4% ed una incidenza media in Italia di 12 nuovi casi su mille abitanti/anno.

La ricerca scientifica ha compiuto grandi progressi nell'ultimo decennio nell'individuare meccanismi patogenetici, criteri diagnostici, clinici e neuroradiologici, strategie di prevenzione e trattamento delle demenze. Dall'introduzione nella pratica clinica di farmaci a dimostrata efficacia

sulla sintomatologia cognitiva del paziente con demenza (inibitori delle colinesterasi, memantina), la ricerca rivolge oggi il suo oggetto di interesse verso le cosiddette “disease modifying therapies”, strategie terapeutiche in grado di agire sui meccanismi patogenetici della malattia, arrestando a diversi livelli la cascata di eventi che porta come conseguenza finale la morte neuronale. Tali farmaci, molti dei quali ancora in sperimentazione clinica, sono tanto più efficaci quanto più precocemente somministrati.

Nell’ottica di identificare nuove strategie terapeutiche che abbiano un impatto sul processo neuropatologico che conduce alla morte neuronale, il presente studio ha il fine di analizzare il ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi delle demenze, attraverso l’analisi dei livelli sierici della NOX2 o gp91-FOX, parte dell’enzima NADPH-ossidasi in pazienti affetti da demenza di Alzheimer (AD) o da demenza vascolare (VaD) e in controlli sani, omogenei tra loro per età, sesso e fattori di rischio cardiovascolari.

Tale risultato, associato all’analisi dei livelli di isoprostani urinari nei tre gruppi, rappresenta uno specchio dell’attivazione di processi di neuroinfiammazione mediati dallo stress ossidativo.

Alcuni studi in letteratura effettuati post-mortem sul cervello di pazienti con AD hanno mostrato la presenza di una risposta infiammatoria da parte della microglia attivata dalla beta-amiloide in stadi precoci di malattia. La NADPH-ossidasi è stata implicata come attore principale di questo processo di neuroinfiammazione e danno neuronale.

Riconoscere la via mediata dalla NADPH-ossidasi microgliale come una delle vie principali della cascata neuropatologica dell'AD consentirebbe di sviluppare terapie mirate a bloccare l'attivazione del suddetto enzima per rallentare o addirittura arrestare la progressione della malattia.

Ultima fase del nostro studio consisterà proprio nel trattare i pazienti arruolati che esprimeranno il loro consenso con fonti alimentari di polifenoli, potenti inibitori della NADPH ossidasi ed osservarne in acuto ed in cronico gli effetti a livello biochimico, strumentale e clinico.

## **LE DEMENZE**

### ***Malattia di Alzheimer e Demenza Vascolare***

Per demenza si intende una sindrome clinica caratterizzata da perdita acquisita delle abilità cognitive ed emozionali, tale da interferire con le normali funzioni della vita quotidiana e con la qualità della vita stessa (4).

Secondo la definizione di demenza riportata sul DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1994) si tratta di: “Deficit cognitivi multipli, inclusi deficit di memoria o almeno uno dei seguenti disturbi cognitivi: afasia, aprassia, agnosia, deficit del pensiero astratto e dalla capacità critica. I deficit cognitivi devono essere tali da interferire con il lavoro e le attività sociali del paziente; inoltre devono rappresentare un deterioramento rispetto ad un precedente livello di funzionamento” (7).

La memoria è il dominio cognitivo più comunemente danneggiato nella demenza. Oltre alla memoria, altre facoltà superiori sono colpite nel processo dementigeno; esse includono linguaggio, abilità visuospaziali, calcolo, giudizio e capacità di problem-solving. In molte sindromi dementigene si sviluppano anche disturbi neuropsichiatrici e alterazioni nelle interazioni sociali, che danno luogo a depressione, isolamento sociale, allucinazioni, delusioni, agitazione, insonnia e disinibizione (8).

Si distinguono forme primarie o degenerative di demenza e forme secondarie come la demenza vascolare e le demenze causate da altre



patologie, alcune delle quali reversibili, come quelle in corso di ipotiroidismo e deficit di vitamina B12 e folati.

Fra le forme primarie la più frequente è la Malattia di Alzheimer, seguita dalla Demenza a Corpi di Lewy mentre più rare sono le demenze fronto-temporali come la Malattia di Pick, e la demenza associata a Malattia di Parkinson.

Fra le forme secondarie le principali sono quelle su base vascolare ischemica, ma non sono rare forme legate a disturbi endocrino-metabolici (ipo ed ipertiroidismo, insufficienza renale cronica, encefalopatia porto-sistemica, ipoglicemia, disidratazione), malattie infettive ed infiammatorie del Sistema Nervoso Centrale (meningiti, encefaliti, AIDS dementia complex, malattie demielinizzanti), stati carenziali (carenza di tiamina, vitamina B12, folati o malnutrizione generale), intossicazioni (alcool, farmaci), traumi cranici e processi espansivi intracranici (neoplasie, ematomi o ascessi).

La Malattia di Alzheimer (AD) è la causa più frequente di demenza (50-60% dei casi); il 5-20% delle demenze è secondario a patologie potenzialmente reversibili; il 10-20% delle demenze è su base vascolare; nel 15% circa dei casi la forma degenerativa e quella vascolare coesistono. (9)

La prevalenza della demenza è in continuo aumento: circa 24 milioni di persone al mondo ne sono affette e, in assenza di novità sulle strategie terapeutico-preventive e di modificazioni della mortalità associata,

questi numeri sono destinati a crescere, raggiungendo i 42 milioni nel 2020 e gli 81 milioni nel 2040 (10).

Il forte impatto sociale di questa patologia non è legato, però, soltanto alla sua elevata frequenza, ma anche al considerevole grado di disabilità che essa comporta: è stato stimato, infatti, che la demenza è responsabile dell'11% circa degli anni di vita vissuti con disabilità nei soggetti con 60 o più anni, assumendo quindi un peso molto maggiore rispetto a quello dell'ictus (9%), delle patologie muscoloscheletriche (8%), delle malattie cardiovascolari (5%), e delle neoplasie (2%) (10).

Questo si traduce in costi sanitari sempre più alti, che i paesi più industrializzati dovranno affrontare: già oggi la spesa sanitaria complessiva legata a queste patologie negli USA supera, infatti, i 100 miliardi di dollari (8).

I costi sociali non si limitano alla sola spesa sanitaria legata alla cura e all'assistenza del paziente con demenza; sono, infatti, molto importanti le conseguenze sulla famiglia, e in particolare sul caregiver, che rimane il caposaldo dell'assistenza al paziente con demenza e che deve affrontare rilevanti problematiche di ordine pratico, psicologico ed economico (11).

Tra le malattie associate all'invecchiamento le demenze si inseriscono quindi fra le più gravi, soprattutto in termini di peggioramento della qualità di vita del paziente anziano e di impatto sociale.

Diventa allora indispensabile acquisire sempre maggiori conoscenze su queste patologie, sulle tecniche che ne permettano una diagnosi

sempre più precoce e accurata e soprattutto sulle strategie preventive, terapeutiche e riabilitative.

La Malattia di Alzheimer (AD) è un processo neuro-degenerativo progressivo. Il primo ad osservare questa patologia, a descriverne i sintomi e gli aspetti neuropatologici è stato un neurologo tedesco, Alois Alzheimer.

L'AD può essere considerata a tutti gli effetti una malattia terminale, che causa un deterioramento generale delle condizioni di salute. Le cause più comuni di morte sono la polmonite o le infezioni intercorrenti, poiché il progredire della malattia porta ad un crescente distacco dalla realtà con perdita di peso, ad un deterioramento del sistema immunitario ed aumentato pericolo di infezioni delle vie respiratorie, delle vie urinarie e/o di altri organi e apparati.

Le prime manifestazioni cliniche sono caratterizzate da un insidioso e ingravescente deficit di memoria che inizialmente è molto sfumato e può passare inosservato; successivamente insorgono disturbi della capacità attentiva e del linguaggio (12). Il deterioramento delle funzioni cognitive si traduce in un'incapacità progressiva a gestire la vita quotidiana, con effetti destabilizzanti sulla qualità della vita non solo dei pazienti, ma anche di chi li accudisce (13).

Man mano che la malattia avanza possono insorgere disturbi del comportamento: aggressività, agitazione, attività non finalizzate ed il vagabondaggio sono comunemente osservati nella fasi più avanzate della Malattia di Alzheimer.

Dal punto di vista neuropatologico, le lesioni tipiche dell'AD sono rappresentate dalle placche senili e dai grovigli neurofibrillari. Le placche senili sono costituite da depositi extracellulari contenenti la proteina  $\beta$  Amiloide ( $A\beta$ ), mentre i grovigli neurofibrillari sono aggregati citoplasmatici intraneuronali costituiti da filamenti elicoidali appaiati composti da proteina tau ( $\tau$ ) iperfosforilata associata ai microtubuli.

Una delle modificazioni più evidenti che si può osservare nei pazienti affetti da AD a livello cerebrale è a carico del sistema colinergico. Si evidenzia una marcata perdita di cellule nel nucleo basale di Meynert (14), nonché una importante riduzione di acetilcolina a livello ippocampale e sottocorticale (15-16). Inoltre, si è constatato che esiste una correlazione tra gravità della malattia e deficit del mediatore chimico.

Mutazioni missense dei geni della proteina precursore della  $A\beta$  (APP) e delle preseniline 1 e 2 (PS1 e PS2) portano ad un meccanismo patogenetico comune, l'alterazione del metabolismo dell'APP, provocando così l'accumulo della proteina  $A\beta$ . Sulla base di queste osservazioni si fonda l'ipotesi della cascata amiloide dell'AD, applicabile anche alle forme sporadiche (fig. 1). I processi che causano l'accumulo di  $A\beta$  sono centrali nella patogenesi dell'AD, essendo responsabili della morte neuronale selettiva e della perdita di sinapsi che caratterizzano la demenza di Alzheimer.

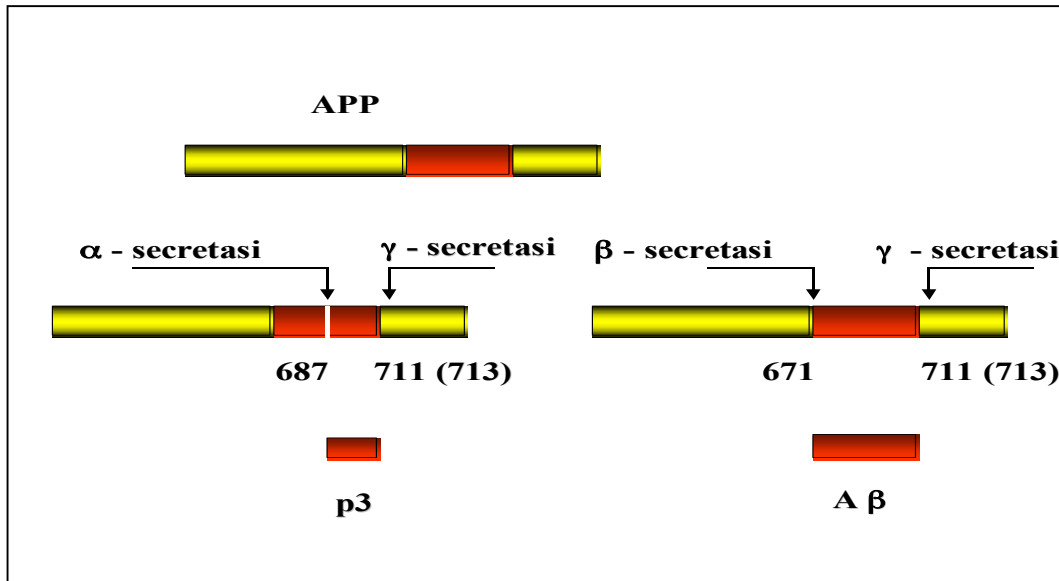


Figura 1: La genesi della proteina  $\beta$  amiloide

Dal punto di vista neuroradiologico alla Risonanza Magnetica Cerebrale si osserva una marcata atrofia cerebrale che determina un'aumentata ampiezza dei solchi cerebrali e l'incremento del volume ventricolare. Tale atrofia interessa oltre al lobo temporale (caratteristica fisiologica nell'anziano) anche le aree associative corticali, l'ippocampo e il giro paraippocampale, con risparmio delle aree posteriori degli emisferi, del cervelletto e del tronco cerebrale (17). Le nuove indagini di medicina nucleare (PET/SPECT) mostrano il corrispettivo metabolico dell'atrofia, ossia un ipometabolismo/ipoperfusione localizzato inizialmente a livello delle regioni temporo-parietali dell'encefalo.

Il trattamento farmacologico dei sintomi cognitivi, in passato piuttosto deludente sul piano dei risultati clinici, ha visto negli ultimi anni una ridefinizione degli obiettivi e delle strategie di intervento, anche se

limitatamente all'AD. Tradizionalmente l'attenzione era concentrata sulla ricerca di farmaci efficaci sul deficit mnesico; tale approccio, oltre che scarsamente efficace sul piano dei risultati, è poco coerente con la realtà clinica della Malattia di Alzheimer, nella quale i deficit neuropsicologici sono complessi e non riconducibili solo a quello mnesico. I primi sforzi sono stati focalizzati sul tentativo di compensare i deficit neurotrasmettitoriali (quello colinergico in particolare) sia attraverso l'inibizione dell'enzima di degradazione dell'acetilcolina, l'acetilcolinesterasi (AChE), che attraverso una diretta stimolazione dei recettori colinergici post-sinaptici (muscarinici in particolare) (18). Attualmente, in Italia gli inibitori dell'acetilcolinesterasi disponibili in commercio sono tre: Donepezil, Galantamina e Rivastigmina. Tutti e tre agiscono in modo simile, poiché appartengono alla stessa classe farmacologica, ma presentano significative differenze in termini di farmacocinetica e farmacodinamica (19). Il Donepezil ha un'azione selettiva sull'AChE, mentre la Rivastigmina agisce inibendo sia l'AChE che una seconda colinesterasi, la Butirilcolinesterasi, una componente delle placche di amiloide e dei grovigli neurofibrillari, che sono la caratteristica della AD. La Galantamina, invece, è l'unica delle tre molecole che possiede, oltre alla capacità di inibire l'AChE, anche un'attività di modulazione allosterica positiva per i recettori nicotinici. Questo approccio ha permesso di dimostrare che tali farmaci dispongono di una efficacia clinicamente dimostrabile nel trattamento dei sintomi dell'AD (cioè l'impatto non è solo sui test neuropsicologici,

ma anche sul quadro clinico complessivo e sull'autosufficienza, ed è rilevabile anche da parte dei familiari), sebbene in una percentuale limitata di pazienti (40%) (20). Si ritiene che, nei pazienti “*responders*”, l'uso degli inibitori dell'AChE rallenti il decorso della malattia di circa 7-12 mesi. Nonostante questi indubbi progressi, la terapia colinergica non modifica la storia naturale dell'AD; ciò ha portato alla ricerca di farmaci in grado di modificare la progressione della malattia (21).

La Memantina è il capostipite di una nuova classe di farmaci per il trattamento della Malattia di Alzheimer. Si tratta di un antagonista a bassa affinità del recettore NMDA (N-Metil-D-Aspartato). Alcuni studi sostengono che l'ipereccitazione dei recettori NMDA esercitata dal glutammato, un neurotrasmettitore, sia alla base della Malattia di Alzheimer. Il glutammato svolge un importante ruolo nei processi di apprendimento e di memoria.

Nella malattia di Alzheimer, il rilascio e l'uptake di glutammato sono malfunzionanti cronicamente ed i livelli basali di glutammato nello spazio intersinaptico sono significativamente e costantemente più alti; ciò contribuisce ad una eccessiva depolarizzazione del neurone postsinaptico con conseguente incremento dell'entrata di ioni  $Ca^{+2}$ . Le elevate concentrazioni di calcio intracellulare favoriscono la formazione di radicali liberi e comportano, inoltre, variazioni dello stato della cromatina nucleare con frammentazioni del DNA che, a loro volta, danneggiano o uccidono le cellule neuronali. Tale processo è indicato come “*eccitotossicità*”, ed è coinvolto nella degenerazione neuronale

che caratterizza la Demenza di Alzheimer. La Memantina quindi agisce proteggendo i neuroni contro l'eccesso di glutammato.

Nuovissima frontiera terapeutica che ha come bersaglio le placche formate da depositi di  $\beta$ -amiloide è rappresentata dalla immunoterapia. Tale strategia ha come scopo quello di "ripulire" il cervello dai depositi neurotossici di  $\beta$ -amiloide.

Nel 1995 furono isolati dei topi transgenici con una mutazione nella APP presente in una famiglia svedese, fu quindi creato un modello animale di malattia di Alzheimer familiare (22). Quattro anni dopo uno studio su tali topi mostrò che la loro ripetuta immunizzazione con peptide  $\beta$ -amiloide preveniva l'accumulo e favoriva l'eliminazione dei depositi di amiloide cerebrale (23). Diciotto mesi dopo fu riportato che anche il declino cognitivo presente in questi topi transgenici poteva essere bloccato dall'immunizzazione attiva (24). Nei modelli murini non fu osservata alcuna tossicità conseguente all'immunizzazione attiva. Tali osservazioni sui ratti fornirono incoraggianti promesse per il trattamento con immunizzazione attiva di pazienti affetti da malattia di Alzheimer. Il primo trial clinico di immunizzazione attiva di pazienti anziani affetti da malattia di Alzheimer sporadica iniziò nel 2001. Tale trial fu bloccato un anno dopo in seguito allo sviluppo di meningoencefalite sterile in quattro pazienti che erano stati sottoposti ad immunizzazione attiva (25). Uno di questi pazienti morì dodici mesi dopo l'ultima immunizzazione per embolia polmonare. L'autopsia mostrò nel cervello di questo paziente la presenza di T-linfociti CD4 a



distribuzione perivascolare. Sebbene non furono stabilite né la funzione né la specificità di questi T-linfociti, fu ipotizzato che la tendenza età-associata a generare reazioni autoimmuni portò tali pazienti a generare linfociti T CD4 autoreattivi che infiltrarono il cervello e causarono la meningoencefalite. Il probabile coinvolgimento di un'eccessiva risposta cellulo-mediata nella tossicità del vaccino è stata supportata da studi sul sangue periferico dei pazienti sottoposti a tale trattamento: l'immunizzazione con  $\beta$ -amiloide portava allo sviluppo di una risposta di classe II (CD4+) di tipo Th1 (26).

Quindi un nuovo tipo di vaccino dovrebbe evitare la risposta cellulo-mediata evitando la stimolazione Th1, attivando una risposta puramente umorale. Alcuni studi hanno mostrato l'effetto di una immunizzazione di modelli murini con un omologo non tossico di  $\beta$ -amiloide in cui erano stati modificati o eliminati gli epitopi che stimolavano una risposta T-cellulare ed era stata chimicamente potenziata la capacità della molecola di scatenare una risposta anticorpale. I topi mostrarono una risposta anticorpale principalmente di tipo IgM, con parziale scomparsa dei depositi di  $\beta$ -amiloide e miglioramenti comportamentali (27).

Il vantaggio della produzione di IgM è anche il fatto che passano la BEE in grado minore rispetto alle IgG e quindi hanno meno probabilità di scatenare una reazione immune nel cervello. Probabilmente questo tipo di immunizzazione potrebbe essere più sicuro della tipica immunizzazione attiva.

Un'altra nuovissima via, esplorata da alcuni recenti studi, è costituita dalla stimolazione dell'immunità innata ottenuta dalla diretta attivazione della microglia attraverso degli specifici recettori. In topi transgenici, tale tipo di immunizzazione avrebbe prodotto una riduzione delle placche amiloidi fino al 90% (28).

Il trasferimento passivo di anticorpi monoclonali anti-  $\beta$ -amiloide sembrerebbe la strada più semplice per fornire anticorpi senza il rischio di stimolare una risposta autoimmunitaria Th1-mediata. Topi transgenici trattati in tal modo hanno avuto una significativa diminuzione delle placche amiloidi e benefici cognitivi (29). Attualmente sono in corso alcuni trial clinici di immunizzazione passiva.

In ogni caso, al di là dei problemi di tossicità, ciò che le strategie di immunizzazione fin qui esaminate non hanno chiaramente dimostrato, è un effetto sulle performance cognitive.

Non sono stati ancora del tutto chiariti i meccanismi con cui la beta-amiloide delle placche svolge i suoi effetti devastanti sui neuroni vicini. Sono state formulate varie ipotesi, tra le quali un aumento del  $Ca^{++}$  intracellulare, uno stress ossidativo abnorme con produzione di radicali liberi, che a loro volta provocano una reazione infiammatoria con liberazione di citochine e stimolazione della microglia.

Su queste premesse potrebbero essere interpretati i risultati di diversi studi clinici che hanno registrato modesti miglioramenti della sintomatologia con l'impiego di calcio-antagonisti e in modo più considerevole con anti-ossidanti, come le vitamine E e C ed i caroteni,

la selegilina o gli estratti di Ginkgo biloba e con farmaci antinfiammatori non steroidei ed infine con gli estrogeni ed il testosterone.

L'obiettivo futuro delle strategie diagnostiche (tecniche di neuroimaging, biomarcatori, analisi genetica) sarà incentrato nell'identificare i pazienti negli stadi precoci di malattia, fase in cui le strategie terapeutiche che intervengono sulla patogenesi della demenza potrebbero avere la massima efficacia. Quando tali strategie terapeutiche diverranno fattivamente disponibili, sarà importante capire in quale modo utilizzarle per ottenere un'efficacia ottimale. Trattamenti che rallentano o arrestano la progressione dell'AD dovrebbero essere usati in pazienti con malattia allo stadio iniziale, prima dell'avvento di un deficit cognitivo significativo. Non sembrerebbe infondato ipotizzare che tali trattamenti attivi sulla patogenesi della demenza potrebbero essere anche utilizzati per prevenire o ritardare l'insorgenza della malattia di Alzheimer in pazienti ad elevato rischio o affetti da Mild Cognitive Impairment. Ai pazienti in stadi di malattia già avanzati andrebbe riservata una terapia di combinazione studiata per ogni singolo paziente, come ad esempio farmaci anti-amiloide e immunoterapia anti-amiloide associata ad inibitori dell'acetilcolinesterasi.

Per quanto concerne il deterioramento cognitivo di origine vascolare, attualmente il termine Demenza Vascolare (VaD) rimane il più usato per indicare un decadimento cognitivo associato alla presenza di lesioni cerebrali di vario tipo, conseguenti a patologie cerebro- e/o cardiovascolari (30).

L'assenza di un preciso inquadramento nosografico di questa patologia, ne ostacola lo studio epidemiologico, anche se crescenti evidenze ne confermano sempre più l'importanza, ponendola al secondo posto fra le cause di demenza nell'anziano, dopo la Demenza di Alzheimer (responsabili rispettivamente del 10-20% e del 50-60% dei casi di demenza nell'anziano) (9).

Dai dati dello studio multicentrico ILSA (Italian Longitudinal Study of Aging), si può evincere che circa 40000 nuovi soggetti si ammalano di Demenza Vascolare ogni anno in Italia, mentre a livello mondiale l'incidenza è di circa 3.8 nuovi casi su mille per anno. (6)

Nelle donne l'incidenza è di 0.3 nuovi casi su mille per anno a 65 anni, 1.36 a 69 anni e 9.3 a 85 e più anni. Negli uomini i corrispondenti valori sono: 1.3, 2.2 e 9.3 (31).

Questo dimostra una maggiore incidenza nel sesso maschile rispetto a quello femminile e un incremento dell'incidenza con l'età.

Tuttavia la percentuale di casi di demenza dovuti a malattia cerebrovascolare diminuisce con l'aumentare dell'età, mentre aumenta la percentuale di casi di Demenza di Alzheimer (31).

Tra i soggetti che presentano un ictus acuto e ne sopravvivono, una quota sensibile va incontro a decadimento mentale classificabile come Demenza Vascolare (demenza post-ictus propriamente detta, ovvero post-stroke dementia).

Alla dimissione, o a tre mesi dall'esordio dell'ictus, una quota oscillante tra il 4% ed il 9% dei malati può definirsi demente. A più lungo termine,

la prevalenza cresce al 15% circa ad un anno. A distanza di 4 anni da un ictus acuto, è stato osservato che, dopo aver escluso i soggetti con demenza "precoce" post-ictus, un ulteriore 21,5% sviluppava demenza nei 4 anni successivi (32).

Questi dati sono particolarmente significativi, se si considera il crescente aumento di incidenza e prevalenza dell'ictus e delle patologie vascolari aterosclerosi-correlate in genere.

Le vie per una diagnosi di demenza vascolare, prevedono, oltre alle manifestazioni classiche della demenza, l'evidenza di una Malattia cerebrovascolare dimostrata dall'esame clinico e dalle immagini radiologiche cerebrali che soddisfino i requisiti minimi di manifestazione di lesioni ed una correlazione temporale con i disturbi, che possono comprendere anche manifestazioni di origine sottocorticale, quali un deficit nelle funzioni esecutive, cambiamenti nella personalità e nell'umore, etc. I criteri di classificazione NINDS–AIREN includono anche i casi di lesioni cerebrali di origine ischemica od emorragica o secondarie ad arresto cardiocircolatorio. Nei primi due casi resta la difficoltà di determinare se il quadro osservato è direttamente responsabile della patologia, precedente o successivo e quanto e se realmente correlato col quadro patologico del momento. Lesioni cerebrovascolari di varia tipologia ricavate dall'imaging possono essere ricondotte a demenze vascolari: Demenza multi-infartuale dovuta all'occlusione di vasi di grosso calibro in aree sia corticali che sottocorticali, Demenza da piccole lesioni ischemiche localizzate in aree

corticali e sottocorticali funzionalmente importanti, Demenza da lesioni come sopra, ma localizzate nei piccoli vasi, Demenza secondaria ad emorragie di varia importanza, Demenza secondaria ad arresto cardiaco, con danni ischemici localizzati od estesi.

Per quanto riguarda le strategie terapeutiche della demenza vascolare un ruolo fondamentale è svolto dagli interventi di prevenzione primaria attraverso il controllo dei fattori di rischio (ipertensione arteriosa, dislipidemia, diabete mellito, fibrillazione atriale, stato trombofilico).

Gli interventi di prevenzione secondaria su soggetti con alterazioni cognitive iniziali ma non ancora definibili come dementi (deterioramento cognitivo vascolare lieve) dovrebbero essere rivolti al rallentamento della progressione delle lesioni vascolari presenti o all'arresto dell'insorgenza di nuove lesioni cerebrali e al miglioramento delle funzioni cognitive compromesse. In questo caso le possibili strategie dovrebbero essere mirate alla prevenzione della ricorrenza di ictus e all'intensificazione del controllo dei fattori di rischio.

Per quanto riguarda interventi atti al rallentamento della progressione delle lesioni vascolari già presenti un sottostudio recente del più grande studio PROGRESS ha valutato circa 200 pazienti con RM cerebrale misurando la progressione nel tempo delle alterazioni della sostanza bianca ed evidenziando che il trattamento con perindopril ed indapamide era in grado di ridurre significativamente il volume di queste lesioni che si sviluppavano durante il periodo di osservazione (36 mesi in media) (33).

Per quanto riguarda, invece, il miglioramento delle funzioni cognitive di soggetti non ancora dementi ma con iniziale deterioramento cognitivo di tipo vascolare non esistono ancora dati al riguardo, di nessun livello di evidenza.

Gli interventi terapeutici e di prevenzione secondaria in soggetti già definibili come dementi dovrebbero invece essere rivolti al rallentamento della progressione delle lesioni vascolari presenti o all'arresto dell'insorgenza di nuove lesioni cerebrali e al miglioramento delle funzioni cognitive compromesse tramite agenti farmacologici o interventi chirurgici.

Anche in fase di demenza conclamata ci potrebbe ancora essere spazio per approcci volti al miglioramento del controllo dei fattori di rischio presenti quali l'ipertensione arteriosa, il diabete, le iperlipemie, il fumo e l'iperomocisteinemia. Uno studio osservazionale non-randomizzato e non controllato su 52 pazienti ha dimostrato che il controllo dei fattori di rischio vascolare (in primo luogo l'ipertensione arteriosa) può essere benefico dal punto di vista cognitivo anche in pazienti già affetti da demenza vascolare (34).

Per quanto riguarda il miglioramento delle funzioni cognitive compromesse, un gran numero di farmaci è stato testato nel corso degli anni in pazienti affetti da deterioramento cognitivo di probabile o possibile origine vascolare (35).

I risultati di questi studi si sono dimostrati generalmente insoddisfacenti. Attualmente di nessun farmaco è stata documentata con sicurezza

l'efficacia nella terapia della demenza vascolare e nessun trattamento è attualmente approvato dalle agenzie del farmaco statunitense (FDA) ed europea (EMA). I parametri della *American Academy of Neurology* del 2001 (36) affermano che non esiste nessuno studio adeguatamente controllato nella demenza vascolare ischemica che dimostri una efficacia farmacologica.

I farmaci sperimentati nel campo della demenza vascolare sono riconducibili ad un'ampia gamma di classi farmacologiche.

Farmaci anti-aggreganti quali l'ASA (325 mg/die) sono stati proposti inizialmente sulla base di studi terapeutici di piccole dimensioni (37 pazienti ASA, 33 placebo) che mostravano un miglioramento o una stabilizzazione del declino cognitivo (37). Al momento non sono però disponibili dati di studi terapeutici sufficientemente ampi e metodologicamente corretti volti alla valutazione dell'efficacia dei farmaci antiaggreganti sulle funzioni cognitive di pazienti affetti da demenza vascolare. In conclusione, l'uso di antiaggreganti piastrinici quale l'ASA è indicato per la profilassi secondaria di ictus ischemici aterotrombotici ma non per effetto immediato sulle funzioni cognitive. È tuttavia possibile che la prevenzione di ulteriori eventi ischemici focali ottenuta con l'ASA possa impedire un aggravamento del quadro cognitivo.

L'uso degli anticoagulanti orali nella demenza vascolare dovrebbe essere limitato nell'ambito di misure di profilassi primaria e secondaria



di eventi cerebrali ischemici in pazienti con patologie a dimostrato rischio cardio-embolico.

Un recente studio condotto in 321 pazienti con demenza vascolare di grado lieve-moderato ha dimostrato che la memantina è efficace al dosaggio di 10 mg x 2/die nel ridurre il declino cognitivo misurato dalla scala ADAS-COG in confronto al gruppo placebo (38). La differenza delle medie dei punteggi ADAS-COG fra i due gruppi era di 2,0 con il gruppo trattato che si manteneva sostanzialmente stabile a 6 mesi. Le differenze però in questo caso non appaiono particolarmente significative nel confronto con il gruppo placebo e pertanto, anche in considerazione della differenza di soli due punti sulla scala ADAS-COG, un giudizio sulla reale efficacia clinica del farmaco resta sospeso.

Un'altra classe di farmaci testati nella terapia della demenza vascolare è quella dei calcio-antagonisti. Fra questi la nimodipina è la molecola su cui sono disponibili più dati. Una recente revisione Cochrane ha concluso che la nimodipina può essere di qualche beneficio nel trattamento di pazienti affetti da demenza vascolare (39).

Un importante recente approccio alla terapia della demenza vascolare è quello dell'uso degli inibitori dell'acetilcolinesterasi, farmaci finora proposti ed approvati per la terapia della malattia di Alzheimer di grado lieve-moderato. Il donepezil è stato impiegato in due studi internazionali randomizzati a dosaggio di 5 o 10 mg/die che includevano pazienti con demenza vascolare possibile o probabile in accordo ai criteri NINDS-AIREN. I risultati indicano che questo farmaco è efficace nel migliorare

la funzione cognitiva e il giudizio clinico globale oltre alle attività della vita quotidiana (40).

Gli altri farmaci della categoria per cui sono disponibili risultati in pazienti affetti da demenza vascolare sono la galantamina e la rivastigmina.

Per la rivastigmina, mentre sono in corso sperimentazioni randomizzate, sono disponibili solo dati preliminari da uno studio in aperto (41) nel quale si mostrava un qualche effetto terapeutico del farmaco in pazienti con forma sottocorticale di demenza vascolare. Della galantamina sono disponibili i risultati di uno studio condotto in una popolazione mista di pazienti affetti da probabile demenza vascolare e malattia di Alzheimer con concomitanti lesioni vascolari (42). Il farmaco si è dimostrato efficace nel determinare una variazione di 2,6 punti sulla scala ADAS-COG rispetto al punteggio del gruppo placebo, composto da 196 pazienti.

Visto il costo molto elevato di questi farmaci, rimane da studiare il rapporto costo-beneficio nella terapia di una condizione cronica quale la demenza vascolare anche nel senso di un mantenimento degli effetti a lungo termine, visto che tutti gli studi hanno breve durata (6 mesi) e non hanno valutato gli effetti a più lungo termine.

Per il trattamento della demenza vascolare sono state indagate anche altre classi farmacologiche tra cui i derivati dell'ergot. La nicergolina, è stata testata in uno studio randomizzato in doppio cieco in un gruppo di 136 pazienti diagnosticati come demenza multi-infartuale lieve-

moderata secondo i criteri del DSM-III (43). I pazienti trattati con il farmaco al dosaggio giornaliero di 30 mg x 2 mostravano punteggi migliori dopo 6 mesi sulla Sandoz Clinical Assessment Geriatric Scale e al MMSE.

L'importanza crescente del fenomeno demenze impone una necessità sempre più urgente di acquisire maggiori conoscenze su questo gruppo di patologie, sulle tecniche che ne permettano una diagnosi più precoce e accurata e soprattutto su strategie preventive e terapeutiche che agiscano sui meccanismi che sono alla base della cascata neuropatologica che conduce alla morte dei neuroni e alla conseguente progressiva perdita delle capacità cognitive.

## NOX2, STRESS OSSIDATIVO E DEMENZA DI ALZHEIMER

La “Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate” (NADPH) è una molecola organica che funge da scambiatore di elettroni all'interno delle cellule sia animali che vegetali.

Nelle cellule animali essa passa dalla forma ossidata (NADP+) a quella ridotta (NADPH) grazie alla Glucosio-6-fosfato deidrogenasi, all'inizio del ciclo dei pentoso-fosfati. Passa successivamente dalla forma ridotta alla forma ossidata, riducendo a sua volta altri composti che esplicano funzioni fondamentali per la cellula, come il Glutathione solfato (GSH) che ha funzione di antiossidante.

Esistono sette isoforme di NADPH ossidasi (Figura 2): Nox1-5, Duox1-2. La Nox 2 è quella più studiata ed è presente nei macrofagi e nelle cellule endoteliali. Essa consta di quattro subunità citosoliche (p47phox,p67phox,p40phox,Rac1) e 2 porzioni trans-membrana (gp91phox e p22phox).

	Other Names	Chromosome Location	Gene Length	Amino Acids	Total SNP	cnSNP	cnSNP Amino Acid Change	cnSNP Nucleotide Substitution
NOX1	NOH-1, MOX1, GP91-2	Xq22	30374	564	79	1	His315Arg	A944G
NOX2	CYBB, gp91 <sup>phox</sup>	Xp21.1	33451	570	69	3	Ser472Gly, Asn303His, Asp500Gly	A1414G, A907C, A1499G
NOX3	GP91-3	6q25.1-26	60534	568	228	1	Lys171Thr	A512C
NOX4	RENOX, KOX-1, KOX	11q14.2-q21	165139	578	858	1	Ile315Met	A945G
NOX5		15q22.31	42392	747	263	8	Gln134His, Leu362Phe Gly741Arg, Glu593Lys Gly191Glu, Phe133Leu Asn505Lys, His558Arg	G402T, C1084T G2221A, G1777A G572A, T399G T1515G, A1673G
DUOX1	Thox1, LNOX1, NOXEF1	15q21	35583	1,551	188	4	Arg1026Cys, Thr962Ile Phe1178Leu, His1216Arg	C3076T, C2885T T3532C, A3646G
DUOX2	Thox2, LNOX2, NOXEF2, p138 <sup>lox</sup>	15q15.3-q21	20757	1,548	188	6	His683Arg, Glu143Asp Arg200Gly, Gln1009Arg Pro138Leu, Ser1067Leu	A2048G, A429C A598G, A3026G C413T, C3200T
p22 <sup>phox</sup>	CYBA	16q24	9486	195	117	7	Gln158Arg, Thr75Ala Phe38Ser, Thr29Ala Val174Ala, His72Tyr Arg24Gly	A473G, A223G T113C, A85G T521C, C214T* A70G
p47 <sup>phox</sup>	NOXO2, NCF1, NCF47K	7q11.23	15349	390	76	0		
NOXO1	p41NOX	16p13.3	2522	370	13	0		
p67 <sup>phox</sup>	NOXA2, NCF2	1q25	34845	526	125	4	Met279Thr, Trp395Arg Arg181Lys, Gln389His	T836C, T1189C A542G, A1167C
NOXA1	p51NOX	9q34.3	11011	483	38	0		
p40 <sup>phox</sup>	NCF4	22q1.3.1	17028	339	100	4	Thr29Ile, Ans118Ser Glu304Ala, Pro272Leu	C86T, A353G A911C, C815T

Figura 2: Isoforme e subunità della NADPH-ossidasi. (Berdard K and Krause KH. *Physiol Rev* 87: 245–313, 2007).

La NOX2, conosciuta anche come gp91phox, è il prototipo della NADPH ossidasi. Le sue caratteristiche biochimiche sono state studiate approfonditamente. Essa consta di quattro/sei domini transmembrana. Il dominio COOH terminale e quello NH2 terminale sono localizzati nel citoplasma. La NOX2 umana è una proteina altamente glicosilata. Basti pensare che l'isoforma glicosilata ha un peso molecolare di 70-90 kDa, mentre la rimozione dei carboidrati mediante endoglicosidasi fa arrivare il peso della parte proteica a 55 kDa. Le catene carboidratiche sono composte da N-acetilglucosamina e galattosio ed in minor misura da fruttosio, mannosio e glucosio.

La NOX2 è stata inizialmente descritta nei granulociti neutrofilii, monociti/macrofagi e microglia ed è spesso definita come la subunità catalitica del complesso enzimatico NAPH-ossidasi fagocitaria (PHOX) (44). In vari lavori la NOX2 è ancora considerata come specifica di organi ad alta espressione fagocitaria. Tuttavia, in studi di distribuzione tissutale dell'mRNA specifico essa è risultata l'isoforma di NOX a più ampia distribuzione tissutale (timo, piccolo intestino, colon, milza, pancreas, ovaio, placenta, prostata, testicolo). Probabilmente l'ampia distribuzione tissutale può essere dovuta alla presenza di fagociti o contaminazione sanguigna nei tessuti dai quali è stato estratto l'mRNA, tuttavia una crescente evidenza mostra la presenza della NOX2 in cellule non fagocitiche come neuroni, cardiomiociti, cellule muscolari scheletriche, epatociti, cellule endoteliali, cellule emopoietiche (45).

La NOX2 fagocitaria è stata molto studiata. Nei granulociti neutrofili non attivati NOX2 e p22phox sono situate principalmente nella membrana e nelle vescicole intracellulari. Esse coesistono in stretta associazione, con effetto costabilizzante una sull'altra.

Vari fattori come l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia, il diabete, le infezioni batteriche possono attivare la NADPH ossidasi, generando ROS: tale attivazione richiede dei cambiamenti conformazionali dell'enzima e attivazione della trasduzione del segnale (46).

Quando il fagocita viene attivato, la fosforilazione della p47phox granulocitaria porta ad una modificazione conformazionale che permette l'interazione di questa con la p22phox. Il movimento della p47phox porta con sé le altre subunità presenti nel citoplasma del fagocita p67phox, p40phox e Rac 1/2 a formare il complesso NOX2 attivo. Avvenuta tale attivazione le vescicole fagocitarie contenenti la NOX2 si uniscono alla membrana del fagocita. Il complesso enzimatico attivo trasporta quindi elettroni dal NADPH citoplasmatico all'ossigeno extracellulare a generare anione superossido.

Diverse evidenze di letteratura indicano come lo stress ossidativo svolga un ruolo patogenetico rilevante sia nell'invecchiamento precoce che in alcune gravi patologie a sfondo infiammatorio e/o degenerativo, quali l'aterosclerosi e l'AD (47). Esso è l'effetto indesiderato dell'alterazione di un equilibrio biochimico e, come tale, può influenzare l'esordio e/o il decorso di un gran numero di patologie.

All'interno dell'organismo umano vi sono multiple fonti potenziali di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (ad esempio la respirazione mitocondriale) che possono contribuire alla patogenesi di varie patologie. Prendendo in esame tutte le fonti di produzione di radicali liberi, l'enzima NADPH-ossidasi riveste un ruolo di rilevante importanza ed è dedicato alla specifica produzione di anione superossido ( $O_2^{\bullet-}$ ).

Alcuni enzimi della famiglia NOX sono espressi in tutto il Sistema Nervoso Centrale (SNC), con maggior rappresentazione nei neuroni, astrociti e glia di alcune aree quali la corteccia e l'ippocampo. I suddetti complessi enzimatici svolgono numerose funzioni biologiche quali differenziazione cellulare, apoptosi, vie di segnale interneuronali durante lo sviluppo. Sono state implicate in meccanismi di plasticità neuronale quali la memoria e l'apprendimento. Tuttavia gli enzimi della famiglia NOX hanno un ruolo ben conosciuto nei meccanismi di difesa comprendenti infiammazione e stress ossidativo che, qualora iperattivati da un insulto patogeno, conducono alla neurodegenerazione.

Numerose evidenze scientifiche dimostrano che la microglia, sistema cellulare con competenze immunitarie all'interno del sistema nervoso centrale, svolge un ruolo importante nelle patologie neurodegenerative, inclusa la malattia d'Alzheimer (48). Sebbene la funzione della microglia sia benefica e obbligatoria per il normale funzionamento delle cellule neuronali, una sua "upregulation" diventa tossica e dannosa per esse. La placca beta-amiloide può esser identificata come un primo trigger

pro-infiammatorio per l'attivazione della microglia e la produzione di citochine pro-infiammatorie e di ROS (49) (Figura 3). Evidenze attuali dimostrano come la risposta della microglia al danno neuronale può essere duratura; essa, infatti, si autoalimenta ed è tossica per i neuroni (50).

Numerosi studi in letteratura mostrano, inoltre, come lo stress ossidativo possa essere direttamente causa della formazione di placca A $\beta$  (51). Sebbene il ruolo delle specie reattive dell'ossigeno ( ROS ) nella formazione della placca amiloide non sia ben chiaro, forti evidenze scientifiche mostrano un ruolo pilota dell'enzima NADPH ossidasi nella formazione dei ROS e nell'attivazione della cascata delle fosfolipasi PLA2, determinante nel danno neuronale (52).

La reazione neurotossica causata dalla placca amiloide è indotta o attraverso l'attivazione del recettore NMDA del glutammato o attraverso l'attivazione della NOX-2. L'attivazione del recettore NMDA, a sua volta, oltre a determinare eccitotossicità calcio-dipendente, partecipa al meccanismo di attivazione di danno neuronale NADPH-ossidasi-mediato.

L'attivazione della NOX-2 dipende dalla fosforilazione delle sub unità citosoliche attraverso la proteina kinasi C della p47phox nei monociti e tirosin-kinasi nelle cellule endoteliali. Successivamente al cambiamento conformazionale, la sub unità citosolica della NOX2 si unisce alla porzione di membrana gp91phox determinando la forma attivata della stessa che produce ROS, i quali fungono da trigger per ERK1/2,



proteina richiesta per l'attivazione della fosfolipasi c-PLA2 e per l'autoalimentazione della NADPH-ossidasi con conseguente apoptosi neuronale (53).

L'attivazione della fosfolipasi c-PLA2, enzima che svolge un ruolo importante nella patogenesi delle malattie neurodegenerative, ha delle importanti conseguenze fisiologiche: 1) alterazioni dell'omeostasi di membrana, modificazione tipica delle malattie neurodegenerative; 2) attivazione delle caspasi 3 e 9 con conseguente morte della cellula neuronale; 3) produzione di acido arachidonico, il quale può agire come un messaggero retrogrado nei neuroni, modulando in tal modo l'apprendimento e i processi di memoria ; 4) attivazione NF-Kb, fattore trascrizionale di espressione di geni pro infiammatori quali la ciclossigenasi e la s-PLA-2, proteina pro infiammatoria (54; 55).

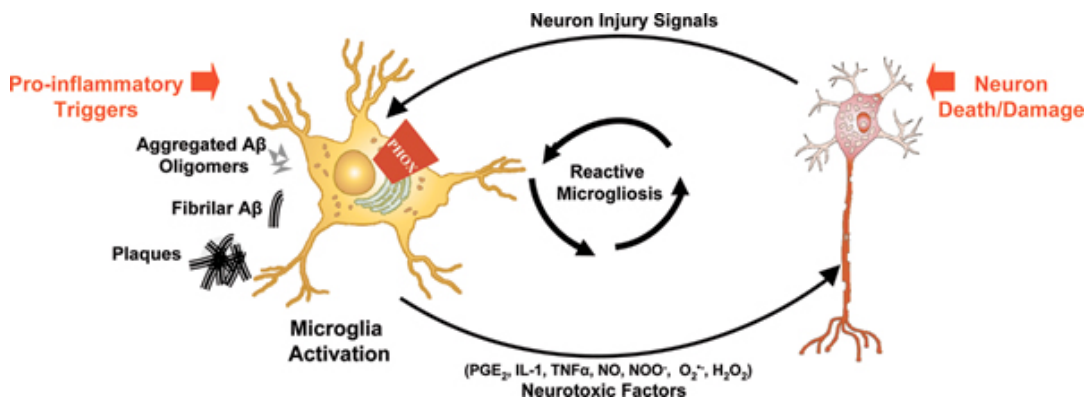


Figura 3: Effetti della deposizione di A-beta sulla microglia. (Block ML. Neuroscience 2008; 9(2): S8)

Numerosi studi in letteratura hanno mostrato come alterazioni nell'attività della NOX possano essere implicate nella patogenesi

dell'AD, suggerendo in particolare come un aumento dell'attività del suddetto enzima possa essere uno degli eventi precoci nella transizione tra stato cognitivo normale e demenza (56).

Un recente lavoro autoptico ha approfonditamente esplorato la relazione tra NOX e AD con particolare attenzione ai livelli delle differenti subunità e al grado di deterioramento cognitivo misurato attraverso Mini-Mental State Examination nell'arco dei 12 mesi precedenti il decesso (57).

I risultati dello studio hanno mostrato un incremento di attività della NOX (con aumento dei ROS e conseguente stress ossidativo) nella corteccia frontale e temporale precocemente nella progressione di malattia e durante tutto il suo decorso clinico, con livelli ancora più elevati negli stadi terminali.

Si può quindi affermare che la produzione di ROS comporti un vantaggio nelle prime fasi della vita in cui esso è essenziale in alcuni processi molecolari sottostanti a varie funzioni biologiche quali trasduzione del segnale, plasticità neuronale e memoria. Per contro, un'intensa attivazione della NOX nelle fasi dell'invecchiamento produce effetti dannosi legati ad un aumento dello stress ossidativo.

In conclusione, l'attivazione della microglia causata dalla deposizione di beta-amiloide nel SNC potrebbe essere la fonte principale dello stress ossidativo correlato alla patogenesi dell'AD. Concentrandosi quindi su tale meccanismo si potrebbe arrivare a conoscere la chiave di un

approccio terapeutico che punti ad intervenire sulla progressione di patologia.

La ricerca scientifica ha per questo motivo studiato molecole in grado di bloccare l'attivazione della NOX2 a livello microgliale. I farmaci antinfiammatori testati per il loro potenziale ruolo neuroprotettivo nell'AD sono in grado di bloccare bersagli posti a valle della cascata infiammatoria quali le prostaglandine E2. Bloccare la NADPH-ossidasi, invece, consente di inibire la risposta microgliale pro-infiammatoria più a monte nel processo neurotossico, essendo anche in grado di bloccare la liberazione di citochine (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE2), ossido nitrico, specie reattive dell'ossigeno, ed ottenere quindi un effetto neuroprotettivo. Recentemente ad alcuni peptidi (polipeptide attivante l'adenilato-ciclastasi, dinorfina, leucina encefalina) (58), antibiotici (minociclina) (59) e piccole molecole (destrometorfano, statine, naloxone) (60), è stata riconosciuta un'azione inibitoria sulla NADPH ossidasi e quindi neuroprotettiva. Il destrometorfano, in particolare, è un antagonista recettoriale non competitivo del recettore dell'N-metil-d-aspartato (NMDA) con effetto neuroprotettivo attraverso l'inibizione dell'attivazione microgliale e dell'attivazione della NADPH-ossidasi (studi in vivo (61) e modelli in vitro (62) di malattia di Parkinson). Recenti lavori attribuiscono un effetto neuroprotettivo per inibizione della microglia alla memantina, antagonista del recettore NMDA, molecola già a disposizione del clinico nel trattamento della malattia di Alzheimer (63).

Per quanto riguarda questa molecola sono stati descritti anche altri meccanismi responsabili dell'azione neuroprotettiva.

Un recente studio su colture cellulari ha attribuito alla memantina un effetto neurotrofico mediato da un aumento di produzione di Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) da parte degli astrociti e un effetto neuroprotettivo attraverso l'inibizione dei processi infiammatori microglia-mediati. Tale effetto sarebbe causato dall'azione inibitoria sulla FOX microgliale e porterebbe ad una ridotta produzione di agenti pro-infiammatori quali superossido, radicali liberi dell'ossigeno, TNF $\alpha$ , PGE2, nitrossido (64). Alla luce del suo ruolo neuroprotettivo, l'utilizzo della memantina potrebbe quindi essere preso in considerazione nel trattamento degli stadi precoci della demenza.

Altri studi, invece, hanno posto la loro attenzione sulle proprietà di antiossidanti naturali quali i polifenoli. Alcuni di essi dimostrano come i polifenoli presenti nella dieta abbiano proprietà inibitorie sulla NADPH-ossidasi e quindi possano avere un potenziale ruolo neuroprotettivo attraverso la suddetta azione (65). I flavonoidi presenti nella dieta, soprattutto in alimenti ad origine vegetale, sono potenti inibitori della NADPH-ossidasi. Il regolare consumo di tali composti è stato associato con miglioramento delle funzioni cognitive e riduzione del rischio di demenza (66). Una sottoclasse di flavonoidi, chiamati flavanoli, largamente presenti nel cacao, tè verde, vino rosso ed alcuni tipi di frutta, sembrano essere efficaci nel rallentare o addirittura arrestare la riduzione delle performance cognitive età-correlata. I flavanoli alimentari

migliorano inoltre la funzione endoteliale e abbassano la pressione sanguigna causando vasodilatazione periferica e cerebrale. In uno studio su modelli murini di invecchiamento, è stato descritto un miglioramento delle performance cognitive dopo somministrazione di estratti polifenolici derivati dal cacao (67). Risulta quindi molto interessante la prospettiva di indagare nuove strategie terapeutiche che modifichino il decorso di malattia delle demenze attraverso meccanismi neuroprotettivi in grado di ridurre lo stress ossidativo e l'infiammazione cronica che conducono alla neurodegenerazione.

## **MATERIALI E METODI**

Abbiamo incluso nel nostro studio caso/controllo 90 pazienti di età compresa tra i 65 e gli 85 anni consecutivamente afferiti al Centro di Valutazione Alzheimer (UVA) del Dipartimento di Scienze Cardiovascolari, Respiratorie, Nefrologiche, Anestesiologiche e Geriatriche del Policlinico Umberto I, "Sapienza" Università di Roma, di cui 30 affetti da demenza di Alzheimer probabile secondo i criteri dell'Istituto Nazionale per i Disturbi Neurologici e Comunicativi – Associazione Malattia di Alzheimer e Disturbi Associati (NINCDS-ADRDA), 30 affetti da demenza vascolare probabile secondo i criteri dell'Istituto Nazionale per i Disturbi Neurologici e Comunicativi e Associazione Internazionale per la Ricerca e l'Insegnamento in Neuroscienze (NINCDS-AIREN) e 30 controlli sani omogenei dal punto di vista clinico ai pazienti dei primi due gruppi (età, sesso, fattori di rischio cardiovascolari). In fase diagnostica tutti i pazienti sono stati sottoposti a test neuropsicologici, indagini di neuroimaging (TC o RMN encefalo, in alcuni casi dubbi anche SPECT cerebrale) ed esami ematochimici per escludere cause secondarie di demenza.

Sono stati inclusi nello studio pazienti con uno score di MMSE inferiore a 24/30 per i due gruppi affetti da demenza uno Score tra 27 e 30 per il gruppo di pazienti sani. Sono stati esclusi tutti i pazienti affetti da patologie neurologiche, infiammatorie e neoplastiche e pazienti che fossero in trattamento con terapia antiossidante e/o antinfiammatoria.

Tali individui hanno spontaneamente accettato di esser arruolati nello studio manifestando la loro volontà attraverso la firma di un consenso informato; sono stati, quindi, sottoposti a prelievo di sangue venoso periferico per la valutazione dei livelli di sNOX2dp, raccolta di un campione di urine per la valutazione dell'escrezione urinaria di isoprostani (8-iso-PGF2 $\alpha$ ), valutazione multidimensionale geriatrica comprendente i test Mini-Mental State Examination (MMSE) per la valutazione cognitiva, Activities of Daily Living (ADL) e Instrumental Activities of Daily Living (IADL) per la valutazione dell'autonomia funzionale, esame obiettivo generale con misurazione dei parametri antropometrici compreso Body Mass Index e circonferenza vita, un Doppler Carotideo con valutazione dell'Intima Media Thickness (IMT) quale marker surrogato di aterosclerosi.

Il MMSE è un test che valuta in ambito clinico le capacità cognitive del soggetto, statisticamente validato e utilizzato a livello internazionale. È costituito da undici item tramite i quali vengono valutate, in modo semplice (la somministrazione del test non richiede più di 10-15 minuti), le varie funzioni cognitive, in particolare l'orientamento temporale e spaziale, la memoria immediata (memoria di fissazione o registrazione), l'attenzione e calcolo, la memoria di richiamo, il linguaggio (denominazione, ripetizione, comprensione orale, comprensione scritta e generazione di frase scritta), la prassia costruttiva. Il valore massimo del test è 30; punteggi uguali o superiori a 24 sono considerati borderline. Si parla di deficit lieve con punteggio inferiore a 24, da

integrare per una diagnosi di deficit cognitivo con una valutazione multidimensionale globale del paziente. Il MMSE è influenzato dal livello di educazione e dalla scolarità del soggetto; per questo motivo il risultato ottenuto deve essere corretto per età e scolarità.

Le scale ADL (Activities of Daily Living) e IADL (Instrumental Activities of Daily Living) strutturate da Lawton e Brody, nel 1969, indagano una serie di abilità sociali e personali riguardanti la cura di se, della casa (soprattutto l' ADL) nonché l'uso degli strumenti di base (telefono, mezzi di trasporto) della vita odierna (settore esaminato dalla IADL). Le scale sono costruite in modo da non essere autosomministrate (cosa impossibile nel caso di un serio deterioramento), ma devono essere compilate dal medico insieme al paziente stesso e al caregiver. Sono costituite da una serie di items, e per ogni item sono previste da tre a quattro risposte alternative. Ad ogni risposta corrisponde un valore, e il punteggio finale corrisponde alla somma dei punti raggiunti in proporzione alla somma teoricamente raggiungibile. L'utilità di queste scale consiste nella standardizzazione e nella possibilità di confrontare i risultati ottenuti, oltre all'agilità dello strumento stesso (somministrabile in pochi minuti). Per l'interpretazione dei risultati, va considerato che più il punteggio è basso, più viene espressa una condizione di inabilità.

I livelli sierici del peptide solubile della NOX2 (sNOX2-dp), marker di attivazione della NADPH-ossidasi, sono stati valutati attraverso il metodo ELISA. Il peptide viene riconosciuto da un anticorpo monoclonale specifico per la sequenza aminoacidica 224-268 della



porzione extramembrana della NOX2 (68). I valori sono espressi in pg/ml.

Gli isoprostani urinari (8-iso-PGF2 $\alpha$ ) sono generati dalla perossidazione dell'acido arachidonico mediata da radicali liberi; sono pertanto considerati marcatori di stress ossidativo. La misurazione di 8-iso-PGF2 $\alpha$  è stata effettuata su 15 pazienti per ogni gruppo, selezionati con un metodo di randomizzazione numerica supportata da software. Per i dosaggi è stato utilizzato un metodo immunoenzimatico precedentemente validato e descritto in letteratura. I valori sono espressi in picogrammi per mg di creatinina (69).

Le categorie variabili sono state riportate in percentuale e le variabili continue rappresentate con media  $\pm$  deviazione standard se non diversamente indicate. Le variabili indipendenti sono state testate con il Test X<sup>2</sup>. Il confronto tra pazienti affetti da Demenza d'Alzheimer (AD) e pazienti affetti da Demenza Vascolare (VaD) è stato effettuato con il test t di Student. L'analisi bivariata è stata eseguita con Test di regressione lineare di Pearson. L'analisi di regressione lineare multipla è stata eseguita usando un metodo di selezione per determinare la correlazione indipendente di due parametri quali Mini-Mental State Examination (MMSE) e sNOX2dp e sNOX2dp e 8-iso-PGF2a. Il valore della  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state ottenute attraverso il software SPSS-18.0 per Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

## RISULTATI

La tabella n.1 riporta le caratteristiche cliniche del campione.

Tabella 1 : Caratteristiche del campione

Variabili	AD ( n=30)	VaD ( n=30 )	P value AD vs VD	CT (n=30)	P value AD/VaD vs CT
Età	70±9	70±9	n.s.	65±7	n.s.
Maschi/Femmine	17/13	17/13	n.s.	17/13	n.s.
Ipertensione (%)	95%	98%	n.s.	95%	n.s.
Diabete (%)	10%	15%	n.s.	7%	n.s.
Dislipidemia (%)	78%	82%	n.s.	78%	n.s.
IMA (%)	5%	5%	n.s.	5%	n.s.
Stroke (%)	3%	5%	n.s.	2%	n.s.
MMSE	23±3	24±3	n.s.	28±2	<0.05
ADL	3±2	3±2	n.s.	6/6	<0.05
IADL	3±2	3±2	n.s.	5/8	<0.05
BMI	16±6	16±6	n.s.	23±3	<0.05
sNOX2-dp (pg/ml)	37	33	n.s.	10	<0.05
IMT(mm)	0.93±0.15	0.96±0.15	<0.05	0.91±0.18	<0.05* solo x VD

Non sono emerse differenze significative tra i tre gruppi per quanto riguarda i fattori di rischio cardiovascolari (ipertensione arteriosa, diabete, dislipidemia, pregresso IMA, pregresso stroke). I pazienti appartenenti ai gruppi Alzheimer e Demenza Vascolare hanno ottenuto punteggi di MMSE significativamente inferiori rispetto al gruppo di controllo. I pazienti con demenza hanno punteggi significativamente più bassi nelle scale ADL e IADL rispetto al gruppo di controllo. I pazienti con VaD hanno valori di IMT significativamente più elevati rispetto ai pazienti AD e rispetto ai controlli. Tale significatività statistica non è emersa nel confronto tra AD e controlli.

L'analisi t-Student ha mostrato come i valori della sNOX2-dp siano aumentati in maniera statisticamente significativa nei pazienti affetti da AD e VaD rispetto ai controlli.

E' stata quindi eseguita una correlazione lineare semplice (Pearson Test) tra sNOX2-dp e MMSE che ha evidenziato un'associazione inversa statisticamente significativa tra questi 2 parametri ( $R=-0.412$ ;  $p=0.001$ ). (Figura 4)

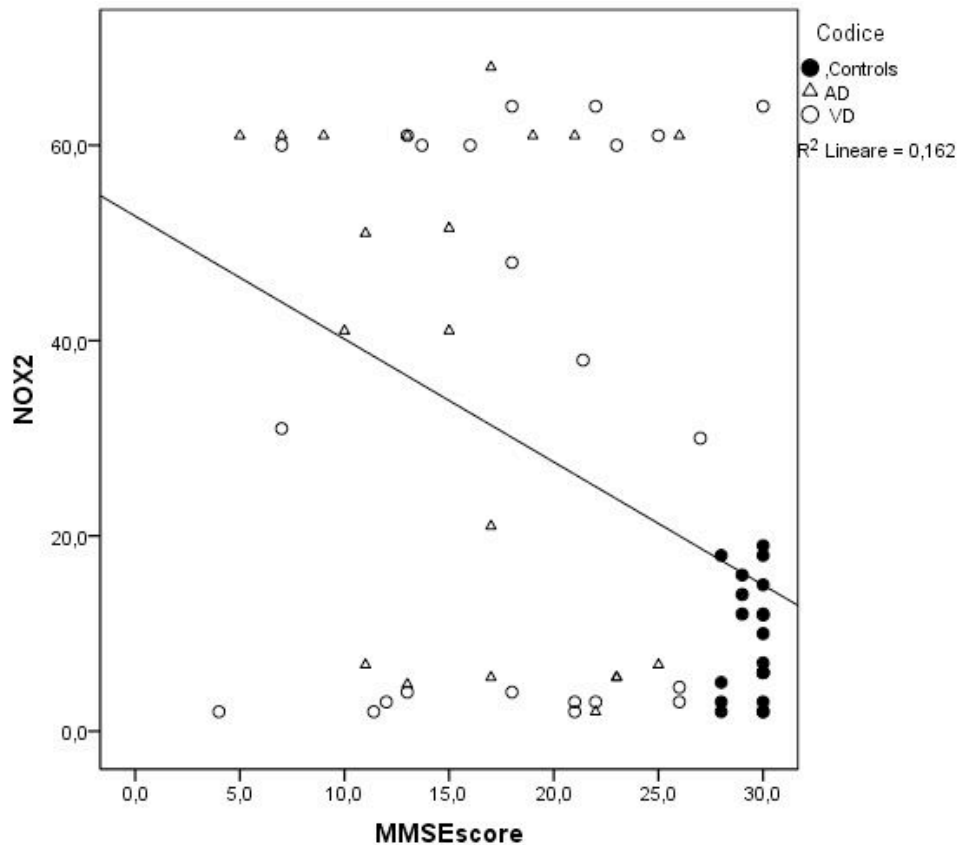


Figura 4: Analisi di correlazione lineare semplice tra MMSE e sNOX2dp nella popolazione in esame.

L'analisi di regressione lineare multipla ha confermato che sNOX2-dp ed MMSE erano indipendentemente correlati tra di loro dopo aggiustamento per i potenziali fattori confondenti quali l'età, la scolarità, l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia, l'infarto, lo stroke.

Sono stati quindi analizzati i livelli di escrezione di isoprostani urinari nei tre gruppi. La tabella n.2 mostra i valori ottenuti.

VARIABILE	AD (N=15)	VD (N=15)	CONT (N=15)
8-iso-PGF2 $\alpha$	185,2 $\pm$ 25,7	163,0 $\pm$ 16,4	116,3 $\pm$ 25,0

Tabella 2: Isoprostani urinari nei tre gruppi

L'analisi bivariata (Pearson test) tra 8-iso-PGF2 $\alpha$  e sNOX2-dp ha mostrato un'associazione statisticamente significativa tra i suddetti parametri ( $r=0.789$ ;  $p<0.001$ ). (Figura 5)

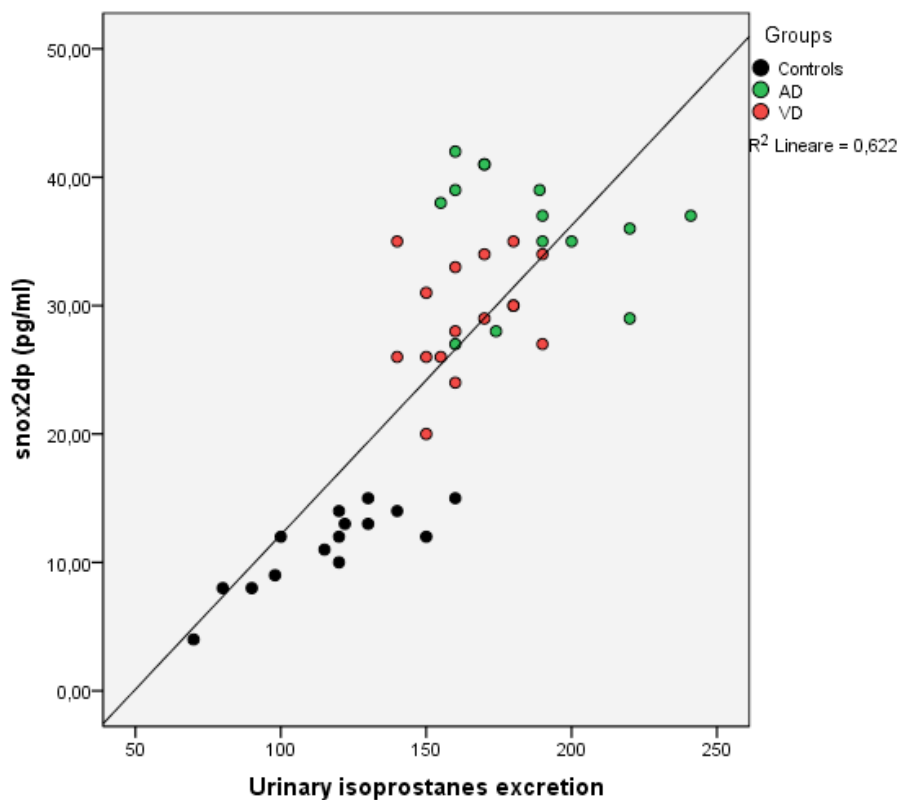


Figura 5: Analisi di correlazione lineare semplice tra 8-iso-PGF2 $\alpha$  e sNOX2-dp nella popolazione in esame.

L'analisi di regressione lineare multipla ha confermato che 8-iso-PGF2 $\alpha$  e sNOX2-dp erano indipendentemente correlati tra di loro dopo aggiustamento per i potenziali fattori confondenti quali l'età, la scolarità, l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia, l'infarto, lo stroke.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

I risultati del nostro studio mostrano come i livelli di attivazione della NADPH-ossidasi siano significativamente più elevati nei pazienti affetti da demenza rispetto ai controlli sani. Tale dato, denotando un aumentato stress ossidativo nei due gruppi AD e VaD, è ulteriormente confermato dai dosaggi di isoprostani urinari, prodotti della perossidazione dell'acido arachidonico mediata da radicali liberi, anch'essi riconosciuti come marcatori di stress ossidativo. I livelli di NOX2 attivata e isoprostani urinari hanno dato evidenza di una correlazione statisticamente significativa, ad ulteriore riprova di quanto detto.

I nostri risultati hanno evidenziato una associazione tra lo stadio clinico di AD e i valori di sNOX-2dp, segno questo di una prolungata attività della placca  $\beta$ -amiloide che determina una up-regulation della NOX2 fino agli stadi più severi di malattia.

Numerose evidenze dimostrano come la via enzimatica che coinvolge la NOX2 aumenti la suscettibilità della microglia agli stimoli pro-infiammatori, quali la deposizione di placca amiloide, e amplifichi la produzione di citochine tossiche, con conseguente attivazione e mantenimento di una risposta neurotossica microgliale cronica.

L'ipotesi amiloide ritiene che la  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), componente chiave della placca senile, abbia, attraverso l'attivazione della neurotossicità microglia-mediata, un ruolo causale nell'AD (70). Infatti, l' $A\beta$  recluta e

attiva la microglia (71). Ciò dimostra che entrambe, A $\beta$  e microglia, hanno un ruolo nella progressione dell'AD (72).

Sfortunatamente, quindi, lo stesso complesso recettoriale necessario alla microglia per riconoscere e fagocitare le fibrille A $\beta$  è anche causa di attivazione della NOX2 e della conseguente produzione di superossido. In questo modo si avvalorava l'ipotesi della NOX2 come fonte di stress ossidativo nell'AD (73).

Studi su modelli animali e, ancor meglio, studi in vitro di modelli di AD forniscono diretta ed indiretta evidenza che l'A $\beta$  aggregata/fibrillare attiva la NOX2 microgliale e che l'inibizione della NOX2 riduca la produzione di superossido (74-75). Anche studi post-mortem hanno indagato il legame NOX2-AD trovando un aumento significativo dell'attività di tale enzima nelle regioni corticali frontali e temporali di soggetti affetti da Mild Cognitive Impairment (MCI) e AD rispetto a controlli cognitivamente integri. E' stata inoltre evidenziata una robusta correlazione tra stato cognitivo ante-mortem e attività della NOX (57). Un recente lavoro ha mostrato aumentati livelli di attivazione ed espressione della NOX nel giro temporale di pazienti con MCI. Non sono stati evidenziati incrementi significativi di espressione/attività della NOX nel cervelletto degli stessi pazienti. Ciò suggerisce che l'incremento di attività della via della NADPH-ossidasi nei neuroni possa partecipare già precocemente alla patogenesi dell'AD (56).

A differenza del nostro lavoro, la maggior parte degli studi effettuati sino ad oggi su questo tema hanno utilizzato, quindi, modelli animali (topi

transgenici con demenza) o cervelli *post-mortem*. Punto di forza del nostro lavoro “in vivo” è il fatto di aver potuto monitorare le funzioni cognitive dei pazienti insieme ai risultati di laboratorio e di aver modo, nel programmato follow-up, di confrontare nel tempo il variare dei valori di NOX2 e isoPGF2 $\alpha$  con la progressione di patologia. Sottoporremo, infine, i partecipanti che esprimeranno il loro consenso ad una fase di intervento con somministrazione di polifenoli da fonti alimentari.

Per quanto concerne il possibile ruolo della NOX2 nella VaD, numerosi studi scientifici suggeriscono come lo stress ossidativo possa essere una delle principali cause di disfunzione endoteliale nella circolazione cerebrale. Esistono diverse potenziali fonti di ROS nel cervello, tra cui xantina-ossidasi, enzimi mitocondriali, ed enzimi coinvolti nella sintesi dell'ossido nitrico. Tuttavia, la NADPH-ossidasi è una delle principali fonti di ROS nei neuroni, nella glia e nei vasi sanguigni cerebrali. E' ormai chiaro come l'età avanzata in sé induca fisiologicamente delle alterazioni cerebrovascolari. Lo stress ossidativo può quindi avere un ulteriore impatto negativo sulle cellule del sistema vasale. Numerose evidenze scientifiche, infatti, supportano il ruolo dei radicali liberi e il danno ossidativo nella patogenesi dello stroke e delle demenze vascolari (76). Alcuni studi mostrano come l'8-isoPGF2 $\alpha$  possa essere utilizzato come marcatore di stress ossidativo nelle demenze vascolari. Inoltre molti trial clinici hanno dimostrato come gli inibitori della NADPH-ossidasi, attenuando la produzione dei ROS, abbiano un effetto normalizzante sulle alterazioni cerebrovascolari. (77)



Inoltre l'analogia dei valori di Nox2 osservati tra i due gruppi (AD e VaD) analizzati può essere spiegata con l'ipotesi vascolare dell'AD, ormai largamente descritta, che riconosce un primum-movens vascolare alla deposizione della placca amiloide (78).

Per concludere, si può quindi affermare che la NOX2 eserciti un ruolo "dualistico" nel nostro cervello: da una parte, la fisiologica produzione di ROS nelle fasi iniziali di vita conferisce un vantaggio all'organismo, dall'altra nelle fasi più avanzate e nell'invecchiamento, in cui già si assiste ad uno sbilanciamento tra produzione endogena di radicali liberi e capacità antiossidanti endogene, l'attivazione sostenuta e aberrante della NOX culmina in effetti nocivi quali l'insorgenza di malattie neurodegenerative.

Gli studi in vitro e su modelli animali che hanno analizzato l'efficacia di potenziali inibitori della NOX2 sono molto promettenti. Purtroppo la maggior parte di tali composti hanno un'azione indiretta sulla NOX2. Ciò incrementa la possibilità di effetti collaterali riducendone l'utilità terapeutica.

Gli sforzi futuri dovranno quindi essere orientati a studiare inibitori della NOX2 più specifici e potenti, in grado di superare la barriera emato-encefalica ed essere sicuri per l'uomo. Di qui, quindi, l'importanza di studi come il nostro che valutino i livelli di attivazione della NOX2 "in vivo", analizzando in tal modo su parametri non solo laboratoristici/sperimentali ma soprattutto clinici la risposta alla somministrazione degli inibitori di questo complesso enzimatico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Intrage: Contro le malattie della terza e quarta età. [www.intrage.it](http://www.intrage.it)
2. ISTAT, Tavole di Mortalità per la Popolazione residente nel 2006.
3. ISTAT, Sezione demografica, [www.istat.it](http://www.istat.it).
4. Marigliano V: Argomenti di Geriatria. Casa Editrice Scientifica Internazionale 2003.
5. Berr C et al. Prevalence of dementia in the Elderly in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005; 15(4):463-71.
6. The Italian Longitudinal Study on Aging. Prevalence of chronic disease in older Italians: comparing self-reported and clinical diagnoses. *Int J Epidemiol* 1997;26:995-1002.
7. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1994.
8. Fauci AS, Braunwald E, et al. Harrison's Principle of Internal Medicine, 17/e. Mc Graw Hill, 2008.
9. Marigliano V. Manuale breve di Geriatria. Società Editrice Universo, 2007.
10. Ferri CP, Prince M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 2005; 366(9503): 2112-2117.
11. Schneider J, Murray J et al. EURO CARE: a cross-national study of co-resident spouse carers for people with Alzheimer's disease: factors associated with carer burden. *Int J Geriatr Psychiatry*, 1999;14: 651–61.

12. Ferris SH, Kluger A: Assessing cognitive function in Alzheimer disease research. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1997; 11 (suppl. 6): 45-9.
13. Cantor MH. Strain among caregiver: a study of experience in the United States. *Gerontologist* 1983; 23: 597-604.
14. Whitehouse PJ, Price DR et al. Alzheimer's disease and senile dementia loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 1982; 215, 1237-1239.
15. Bowen DM, Smith CB et al. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 1976; 99, 459-496.
16. Perry EK, Gibson PH et al. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia: choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci* 1977; 34, 247-265.
17. Katzman R, Jackson JE. Alzheimer disease: basic and clinical advances. *J Am Geriatr Soc* 1991; 39: 516-525.
18. Geroldi C, Bianchetti A, Trabucchi M: Manipulation of the cholinergic system. *Funct Neurol*, 1997; 12: 187-191.
19. Pryse-Phillips W: Do we have drugs for dementia? No. *Arch Neurol* 1999; 56: 735-7.
20. Emilien G, Beyreuther K et al. Prospects for Pharmacological Intervention in Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 2000; 57: 454-459.

21. Aisen PS, Davis KL. The research for disease-modifying treatment for Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 48(S6): S35-S41.
22. Games D, Adams D, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*. 1995; 373: 523–527.
23. Schenk D, Barbour R, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999; 400: 173–177.
24. Morgan D, Diamond DM, et al. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000; 408: 982–985.
25. Orgogozo JM, Gilman Set, al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*. 2003; 61: 46–54.
26. Pride M, Seubert P, et al. Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis. *Neurodegener Dis* 2008; 5: 194–96.
27. Sigurdsson EM, Knudsen EL, et al. An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid- $\beta$  derivatives. *J Neurosci* 2004; 24: 6277–82.

28. Town T, Laouar Y, et al. Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat Med* 2008; 14: 681-87.
29. Bard F, Cannon C, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 2000; 6: 916–19.
30. Roman G.C. Vascular dementia: distinguishing characteristics, treatment, and prevention. *J Am Geriatr Soc*, 2003; 51(5 Suppl Dementia): S296-304.
31. Bowler J.V. Vascular Cognitive Impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005; 76 Suppl 5: v35-44.
32. Van Kooten F, Koudstaal PJ, et al. Epidemiology of post-stroke dementia. *Haemostasis*, 1998; 28: 124-133.
33. Dufouil C, Chalmers J, et al. Effects of blood pressure lowering on cerebral white matter hyperintensities in patients with stroke: the PROGRESS (Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study) Magnetic Resonance Imaging Substudy. *Circulation* 2005; 112: 1644-1650.
34. Meyer JS, Judd BW, et al. Improved cognition after control of risk factors for multi-infarct dementia. *JAMA* 1986; 256: 2203-2209.

35. Inzitari D, Erkinjuntti T, et al. Subcortical vascular dementia as a specific target for clinical trials. *Ann NY Acad Sci* 2000; 903: 510-521.
36. Doody RS, Stevens JC, et al. Practice parameter: management of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001; 56: 1154-1166.
37. Meyer JS, Rogers RL, et al. Randomized clinical trial of daily aspirin therapy in multi-infarct dementia. A pilot study. *J Am Geriatr Soc* 1989; 37: 549-555.
38. Orgogozo JM, Rigaud AS, et al. Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a randomized, placebo-controlled trial (MMM 300). *Stroke* 2002; 33: 1834-1839.
39. Lopez-Arrieta JM, Birks J. Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; (3): CD000147
40. Pratt RD, Perdomo CA. Donepezil-treated patients with probable vascular dementia demonstrate cognitive benefits. *Ann NY Acad Sci* 2002; 977: 513-522.
41. Moretti R, Torre P, et al. Rivastigmine in subcortical vascular dementia. An open 22-month study. *J Neurol Sci* 2002; 203-204: 141-146.

42. Erkinjuntti T, Kurz A, et al. Efficacy of galantamine in probable vascular dementia and Alzheimer's disease combined with cerebrovascular disease: a randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 1283-1290.
43. Herrmann WM, Stephan K, et al. A multicenter randomized double-blind study on the efficacy and safety of nicergoline in patients with multi-infarct dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1997; 8: 9-17.
44. Zhen L et al. Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(21): 9832–9836.
45. Serrano F, Kolluri NS et al. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res* 2003, 988: 193–198.
46. Agnes Simonyi, Yan He, et al. Targeting NADPH oxidase and phospholipases A2 in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 2010 Jun; 41(2-3): 73-86.
47. Bonda DJ, Wang X, et al. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. *Neuropharmacology*, 2010; 59(4-5): 290-4.
48. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 2007; 8: 57-69.

49. Block ML, Hong JS. Microglia ad inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*, 2005; 76: 77-98
50. Block ML, Hong JS. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1127-1132.
51. Nunomura A., Perry G., et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropath Exp Neur*, 2001; 60: 759-67.
52. Agnes Simonyi, Yan He, et al. Targeting NADPH oxidase and phospholipases A2 in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 2010; 41 (2-3): 73-86.
53. Chong YH, Shin YJ, et al. ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *J Biol Chem* 2006; 281: 20315-20325.
54. Kishida KT, Pao M, et al. NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1. *J Neurochem*, 2005; 94: 299-306.
55. Shelat P.B., Chalimoniuk M., et al. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem*, 2008;106: 45-55.



56. Bruce-Keller AJ, Gupta S et al. NOX activity is increased in mild cognitive impairment. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12:1371–1382.
57. Mubeen A Ansari and Stephen W Scheff. NADPH-oxidase activation and cognition in Alzheimer's disease progression. *Free Radic Biol Med*. 2011 July 1; 51(1): 171–178.
58. Qin L, Liu Y, Qian X et al. Microglial NADPH-oxidase mediates leucine enkephalin dopaminergic neuroprotection. *Ann NY Acad Sci* 2005, 1053:107-120
59. Choi SH, Lee DY, et al. Inhibition of thrombin-induced microglial activation and NADPH oxidase by minocycline protects dopaminergic neurons in the substantia nigra *in vivo*. *J Neurochem* 2005, 95:1755-1765.
60. Qin L, Block ML, et al. Microglial NADPH oxidase is a novel target for femtomolar neuroprotection against oxidative stress. *Faseb J* 2005, 19:550-557.
61. Liu Y, Qin L, et al. Dextromethorphan protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 305:212-218.
62. Zhang W, Wang T, et al. Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase. *Faseb J* 2004, 18:589-59.

63. Rosi S, Vazdarjanova A et al. Memantine protects against LPS-induced neuroinflammation, restores behaviorally-induced gene expression and spatial learning in the rat. *Neuroscience* 2006, 142:1303-1315.
64. Wu HM, Tzeng NS et al. Novel neuroprotective mechanisms of memantine: increase in Neurotrophic Factor release from astroglia and anti-Inflammation by preventing microglial activation. *Neuropsychopharm* 2009; 34: 2344-2357.
65. Vafeiadou K, Vauzour D et al. Neuroinflammation and its modulation by flavonoids. *Endocr Metab Immune Disord Drug targets* 2007; 7: 211-224.
66. Nurk E, Refsum H, Drevon CA, et al. Intake of flavonoid-rich wine, tea, and chocolate by elderly men and women is associated with better cognitive test performance. *J Nutr* 2009; 139: 120-7.
67. Bisson JF, Nejd A, et al. Effects of long-term administration of a cocoa poly-phenolic extract (Acticoa powder) on cognitive performances in aged rats. *Br J Nutr* 2008; 100: 94-101.
68. Pignatelli P, Carnevale R, Cangemi R, Loffredo L, et al. Atorvastatin inhibits gp91phox circulating levels in patients with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 360-7.
69. Hoffman SW, Roof RL, Stein DG. A reliable and sensitive enzyme-immunoassay method for measuring 8-isoprostaglandin F<sub>2</sub>

- alpha: a marker for lipid peroxidation after experimental brain injury. *J Neurosci Methods* 1996; 68: 133-6.
70. Qin L et al. Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. *J Neurochem* 2002; 83(4): 973–983.
71. Sasaki A et al. Microglial activation in early stages of amyloid beta protein deposition. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997; 94(4): 316–322.
72. Griffin WS et al. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* 1998; 8(1): 65–72.
73. Wilkinson BL, Landreth GE. The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2006; 3(1): 30.
74. Qin B et al. A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. *Neurobiol Aging* 2006; 27(11): 1577–1587.
75. Wilkinson B et al. Fibrillar beta-amyloid-stimulated intracellular signaling cascades require Vav for induction of respiratory burst and phagocytosis in monocytes and microglia. *J Biol Chem* 2006; 281(30): 20842–20850.
76. Drummond GR, Selemidis S, et al. Combating oxidative stress in vascular disease. NADPH oxidases as a therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2011; 10 (6): 453-471.

77. Guang-Xia Shi, Cun-Zhi Liu et al. Biomarkers of oxidative stress in vascular dementia patients. *Can J Neurol. Sci*, 2012; 39: 65-68
78. De la Torre JC. Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurol*. 2004 Mar; 3(3): 184-90.