

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO
**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
FARMACIA**

TESI DI LAUREA

**APPROCCI FARMACOLOGICI E NUTRIZIONALI
NELLA PREVENZIONE E NEL TRATTAMENTO
DEL BRAIN AGING**

RELATORE: CHIAR.MA PROF. GANDIN VALENTINA

LAUREANDO: ANDREA D'AGOSTINO

ANNO ACCADEMICO: 2023-2024

Indice

1	I FENOMENI DI BRAIN AGING	5
1.1	ALTERAZIONI MORFOLOGICHE DELL'ENCEFALO	5
1.2	ALTERAZIONI DEL TESSUTO NERVOSO	8
1.3	PROCESSI CELLULARI E MOLECOLARI DI DANNO	12
1.4	METABOLISMO ENERGETICO E SUE ANOMALIE	21
1.5	CARATTERISTICHE GENETICHE ED EPIGENETICHE	27
1.6	MICROBIOTA ED INFIAMMAZIONE	29
1.7	ANOMALIE MITOCONDRIALI	33
1.8	SENESCENZA CELLULARE	36
1.9	BIOMARCATORI DI INVECCHIAMENTO CEREBRALE	41
2	INTEGRATORI ALIMENTARI	43
2.1	ACIDI GRASSI POLINSATURI	43
2.2	VITAMINA C	47
2.3	AMMINOACIDI E GLUTATIONE	48
2.4	POLIFENOLI	52
2.5	SPERMIDINA	58
2.6	PROBIOTICI	61
3	CIBI FUNZIONALI	64
3.1	COMPONENTI COMUNI A DIVERSI CIBI FUNZIONALI	64
3.1.1	Amminoacidi	66
3.1.2	Vitamine	66
3.1.3	Antiossidanti	67
3.2	CIBI FUNZIONALI DI ORIGINE VEGETALE	69
3.2.1	Vino rosso ed uva	69
3.2.2	Fragole	70
3.2.3	Acero viola	71
3.2.4	Agrumi e bacche	72
3.2.5	Tè, caffè e cioccolato	76
3.2.6	Curcuma	77
3.2.7	Zafferano	79
3.2.8	Altre spezie	80
3.2.9	Piante nootrope	82

4 FARMACI SPERIMENTALI	84
4.1 GEROPROTETTORI ANTI-ALZHEIMER	84
4.2 FARMACI E COMPOSTI SENOLITICI	87
4.3 LA METFORMINA	91
4.4 TRATTAMENTO DELLE DISFUNZIONI DELLA BEE	95
4.5 COMPOSTI AGENTI SUL TESSUTO ADIPOSO	98
4.6 DERIVATI DEL FENTIZOLO	101
4.7 RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE IPOTALAMICA	104
5 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	108

Sommario

Il *brain aging*, o invecchiamento cerebrale, è un complesso insieme di processi che si sviluppano con l'avanzare dell'età e comportano l'alterazione strutturale e funzionale del cervello. Il danno prodotto è visibile a vari livelli, dalla morfologia dell'organo alla struttura del tessuto e delle singole cellule. Le conseguenze visibili del *brain aging* sono il declino delle capacità cognitive dell'individuo, la perdita della memoria e l'alterazione del comportamento.

Ad oggi, tutti i paesi occidentali stanno sperimentando l'invecchiamento della popolazione, fenomeno che le previsioni vedono in costante aggravamento nel prossimo futuro. Garantire la salute e la buona gestione della terza età sta diventando un bisogno sempre più attuale. In aggiunta, il miglioramento nelle cure di molte patologie ed il prolungamento dell'aspettativa di vita hanno condotto ad un'incidenza in rapido aumento per le forme neurodegenerative, sempre più malattie tipiche della tarda età. Queste patologie risultano molto problematiche per la medicina odierna, le cure disponibili sono spesso insufficienti e prevedono il solo ricorso a farmaci ed approcci sintomatici. È consuetudine ritenere che l'invecchiamento fisiologico del cervello e le manifestazioni patologiche di neurodegenerazione siano fenomeni completamente disgiunti; in realtà, molti processi caratteristici del *brain aging* si ritrovano attivi, in modo molto importante, nell'encefalo di pazienti affetti da malattie neurodegenerative; in questo senso, la neurodegenerazione viene interpretata come l'accelerazione del processo di invecchiamento. Queste considerazioni spiegano bene perché la comunità scientifica sia sempre più attenta alla tematica del *brain aging*, sapendo che una sua migliore comprensione impatterebbe positivamente sulla nostra conoscenza e capacità di gestione delle problematiche tipiche della terza età, conducendo idealmente a nuove e più efficaci terapie. Questo elaborato di tesi consiste di quattro capitoli. Nel primo sono state riorganizzate le informazioni note in letteratura, fornendo una descrizione il più possibile completa ed esauriente del fenomeno del *brain aging*. Cominciando dalla descrizione delle alterazioni anatomico-strutturali tipiche dell'organo e relazionandole alla perdita della sua normale funzionalità, sono stati approfonditi i meccanismi tissutali, cellulari e molecolari attraverso cui queste alterazioni si sviluppano, individuando quelli che la letteratura definisce *hallmarks of aging*. In sede conclusiva, la prospettiva di analisi è stata ampliata, approfondendo alcuni aspetti di particolare interesse ai fini della comprensione dei fenomeni di invecchiamento dell'encefalo, con l'obiettivo primario di individuare potenziali target molecolari su cui intervenire per rallentare tali fenomeni. Le successive tre sezioni sono dedicate a raccogliere le evidenze disponibili in letteratura circa i più promettenti approcci di prevenzione e trattamento dei fenomeni di *brain aging*, divisi nelle consuete categorie di integratori alimentari, cibi funzionali e farmaci. Non essendo possibile, per la vastità dell'argomento, raccogliere in un unico elaborato tutte le informazioni disponibili in letteratura sull'argomento, si è provveduto a selezionare i prodotti più rappresentativi di ogni categoria, cercando di fornire una fotografia completa e soddisfacente dello stato dell'arte della ricerca in questo ambito. I candidati integratori, cibi funzionali e farmaci sono stati analizzati dal punto di vista del meccanismo d'azione molecolare e della capacità di modificare i processi di danno tipici del *brain aging*, riportando le più significative evidenze di efficacia disponibili in letteratura.

1 I FENOMENI DI BRAIN AGING

1.1 ALTERAZIONI MORFOLOGICHE DELL'ENCEFALO

Le alterazioni strutturali che si osservano nei processi di invecchiamento cerebrale possono mostrare una notevole eterogeneità in termini di distretto anatomico e tempo di insorgenza da individuo a individuo. Nonostante ciò, è noto in letteratura un tipico insieme di modificazioni strutturali fondamentali, che ben descrivono i fenomeni di invecchiamento. Molti gruppi di lavoro indipendenti hanno analizzato tali alterazioni attraverso la misura di opportuni stimatori. Il seguente paragrafo espone le evidenze di degenerazione strutturale dell'encefalo, partendo da dati relativi al volume totale dell'organo ed entrando poi nello specifico di alcune sue strutture, facendo riferimento a studi condotti con la tecnica della risonanza magnetica nucleare (RMN). I segni di invecchiamento che saranno trattati in questo paragrafo sono riassunti in Figura 1.

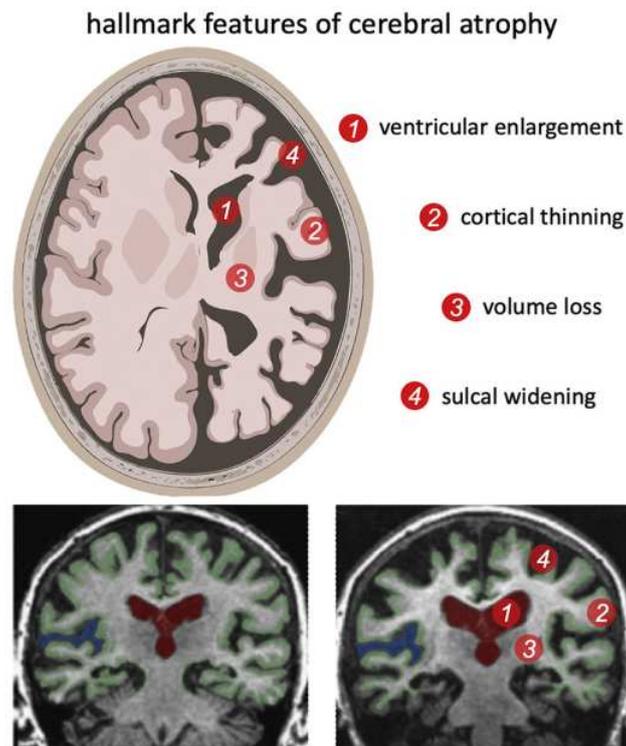


Figura 1: Principali alterazioni nella struttura encefalica che si osservano nei processi di *brain aging* (Blinkouskaya et al., 2021).

Il volume totale del cervello subisce un normale aumento nei primi anni di vita dell'individuo, come conseguenza della conclusione dei processi maturativi a carico del sistema nervoso centrale (SNC). In particolare, il cervello raggiunge il suo massimo volume attorno all'età di nove anni, per poi entrare in

una fase di stabilità, ove non si osservano significativi cambiamenti, che perdura sino ai primi anni della vita adulta. Superati i 35 anni, si riscontra una blanda tendenza alla riduzione di volume, che diviene più evidente oltre i 60 anni (Hedman et al., 2012). A titolo di esempio, in uno studio del 2012 svolto su volontari sani (Hedman et al., 2012) si è misurato un tasso di riduzione dello 0.2%/anno tra i 35 ed i 60 anni, che sale fino a 0.5%/anno una volta superata la soglia dei 60 anni. Valori numericamente più impattanti di riduzione volumetrica si associano allo sviluppo di malattie neurodegenerative. Un altro studio del 2005, svolto su una coorte di 2200 pazienti di età compresa tra 34 e 97 anni, ha consentito di osservare trend di perdita volumetrica differenti nei vari lobi del cervello (DeCarli et al., 2005). Il processo è stato osservato in maniera più chiara a livello del lobo frontale e, secondariamente del temporale, mentre non si sono rilevati cambiamenti significativi a carico dei lobi parietale ed occipitale.

La sostanza grigia encefalica è costituita dalle aree di tessuto nervoso a più elevata densità di somi neuronali, ricchi di derivazioni dendritiche e neuriti a trasmissione prossimale. In queste aree è presente una fitta vascolarizzazione e una notevole densità di cellule gliali di supporto. A livello del cervello, la sostanza grigia si ritrova principalmente nella corteccia e secondariamente in alcune strutture profonde di piccole dimensioni, dette nuclei o gangli della base. I processi degenerativi a carico della sostanza grigia producono un andamento volumetrico che rispecchia lo schema visto per il volume encefalico totale. La sostanza grigia raggiunge rapidamente la piena maturità e rimane stabile in termini volumetrici fino alla prima vita adulta, per cominciare in seguito a degenerare con tasso via via più rapido all'aumentare dell'età. Complessivamente, in un individuo sano molto anziano la contrazione totale della sostanza grigia è stimata attorno al 14% del suo volume massimo (Gunning-Dixon et al., 2009). Una formazione costituita da sostanza grigia di particolare interesse è l'ippocampo, situato presso ciascuno dei lobi temporali dell'encefalo, ai margini della corteccia. Questa struttura ha un ruolo prominente nel controllo della memoria e dell'apprendimento, inoltre sembra essere particolarmente suscettibile a fenomeni neurodegenerativi, mostrando alterazioni importanti in modelli di *brain aging*, con percentuale di riduzione volumetrica del $2,2\% \pm 1,4\%/anno$ nei soggetti sani (Henneman et al., 2009). La perdita di volume della sostanza grigia che costituisce la corteccia encefalica si manifesta attraverso due parametri: l'assottigliamento dello strato corticale e la riduzione dell'area corticale totale. Fenomeni di assottigliamento corticale sono ben descritti in letteratura e risultano significativamente associati all'invecchiamento fisiologico dell'organo. Le manifestazioni sono molto evidenti a carico della corteccia prefrontale, regione implicata nella pianificazione dei comportamenti cognitivi complessi, nell'espressione della personalità, nella presa delle decisioni e nella moderazione della condotta sociale. La riduzione dell'area corticale totale è un fenomeno osservato, ma per il quale la relazione con l'invecchiamento fisiologico non è ancora stata chiarita completamente.

La sostanza bianca è costituita dalle aree del SNC più ricche di proiezioni assoniche a lunga distanza, rivestite o non rivestite da guaina mielinica ed incorporate in una densa struttura gliale. La presenza della guaina mielinica consente di velocizzare di un fattore dieci la trasmissione dei segnali lungo gli assoni,

inoltre essa contribuisce in modo significativo all'integrità anatomica del tessuto. Le cellule gliali sono coinvolte nella regolazione dell'attività neuronale e della disponibilità di nutrienti. La sostanza bianca encefalica si trova in posizione subcorticale ed al di sopra dei nuclei basali, è divisa in una serie di fasci caratterizzati dalla direzione di trasmissione e comprende la struttura del corpo calloso. Il corpo calloso è costituito da un fascio di assoni inter-emisferici che consentono la connessione tra i lobi dei due emisferi dell'organo, si distribuisce in senso antero-posteriore nella profondità del solco inter-emisferico. Il volume della sostanza bianca tende a crescere a lungo durante la vita dell'individuo, di norma raggiungendo un picco entro la quarta decade per poi iniziare a calare, dapprima in modo meno evidente ed in seguito in maniera estremamente significativa. Rispetto a quanto detto per la sostanza grigia, la contrazione volumica della sostanza bianca è un evento più tardivo nell'invecchiamento del cervello e più intenso, con perdite totali fino al 26% (Gunning-Dixon et al., 2009). Anche nel caso della sostanza bianca, sono state osservate differenze tra le perdite volumiche dei diversi lobi, con atrofia molto marcata a livello del lobo frontale e molto più blanda nelle parti posteriori dell'encefalo. È possibile definire per il processo un gradiente antero-posteriore, che può essere visualizzato molto bene nella degenerazione del corpo calloso.

I ventricoli cerebrali sono un sistema chiuso di cavità del SNC, costituito da ampi spazi connessi da stretti canali, in cui circola il liquido o liquor cerebrospinale, con funzioni importanti di perfusione e nutrimento del tessuto encefalico. Il volume delle cavità ventricolari mostra differenze importanti tra i due sessi, essendo nettamente maggiore nell'uomo rispetto alla donna a tutte le età. La riduzione del volume totale dell'encefalo, dovuta ai processi di atrofia della sostanza bianca e, secondariamente, della sostanza grigia, impatta sul volume totale di liquido cerebrospinale e su quello del sistema dei ventricoli cerebrali, i quali tendono ad aumentare durante l'invecchiamento. La dilatazione del sistema dei ventricoli nel corso della vita dell'individuo è notevole, potendo comportare anche il raddoppiamento del volume totale di queste cavità (Coupè et al., 2019). Questo fenomeno comporta una serie di eventi negativi a catena, con aumento della pressione a carico del parenchima encefalico, stiramento e distruzione degli assoni costituenti la sostanza bianca. L'aumento di volume del sistema ventricolare è un segno più precoce di invecchiamento, osservandosi già all'età di circa 30 anni (Pfefferbaum et al., 1994), mentre il volume totale del liquor si mantiene stabile sino ai 50 anni per poi aumentare progressivamente (Nagata et al., 1987). La dilatazione del sistema dei ventricoli cerebrali e l'aumento di volume del liquor cerebrospinale sono legati al declino cognitivo tipico dell'invecchiamento del cervello.

Un ultimo motivo strutturale tipico del cervello, da analizzare in relazione ai processi di invecchiamento, è la forma superficiale della corteccia cerebrale. Si dice *foldings* il processo che conduce alla formazione dei solchi presenti sulla corteccia cerebrale, che ne delimita sotto-aree, note come circonvoluzioni. Il processo del *foldings* è altamente conservato nella specie e rappresenta un notevole vantaggio evolutivo, poiché consente di ottimizzare la struttura della corteccia, diminuendo il volume dell'organo a parità di area corticale. Massimizzando l'area della corteccia è possibile ottimizzare le sue funzioni, tra

cui produzione del pensiero, consapevolezza, memoria, attenzione e linguaggio. Il *fold*ing della corteccia può essere valutato misurando l'indice di girificazione od osservando la morfologia dei solchi. L'indice di girificazione è un valore convenzionale che esprime il rapporto tra la superficie piale del cervello, cioè quella a contatto con il rivestimento delle meningi ed il contorno levigato dello strato corticale, è un numero tanto maggiore quanto più profondo è il *fold*ing dell'organo. L'indice di girificazione aumenta progressivamente nel bambino, fino a maturazione del SNC, anche se non è chiaro a che età questo processo giunga a completamento, alcuni studi affermano ciò avvenga ai quattro anni di età (Cao et al., 2017). Lo stesso studio afferma che l'indice di girificazione segue una traiettoria logaritmica decrescente durante l'invecchiamento del cervello. La riduzione dell'indice di girificazione non mostra alcun gradiente antero-posteriore, risultando abbastanza omogenea in tutta la corteccia encefalica, nonostante si possa osservare in modo lievemente più spiccato a livello del lobo parietale. Il legame tra l'invecchiamento e la regressione del *fold*ing della corteccia è molto più evidente analizzando la geometria dei solchi encefalici, poiché essi, sotto spinta dei fenomeni di invecchiamento dell'encefalo, tendono ad allargarsi e diminuire di profondità. Il fenomeno è massimamente visibile presso il solco frontale superiore, dipende dall'età e diviene molto più evidente nei soggetti al di sopra degli 80 anni, contribuendo a spiegare parte della riduzione dell'indice di girificazione, si stima che il contributo si aggiri intorno al 50% (Madan, 2020).

1.2 ALTERAZIONI DEL TESSUTO NERVOSO

Nel seguente paragrafo saranno analizzati i fenomeni tissutali e cellulari alla base della degenerazione strutturale dell'encefalo, partendo dai meccanismi di danno più importanti a carico della sostanza grigia e della sostanza bianca, per poi soffermarsi sulle alterazioni della rete vascolare e del sistema ventricolare, il cui contributo è assai significativo.

Come già evidenziato in precedenza, la riduzione del volume di sostanza grigia encefalica è una delle alterazioni strutturali più evidenti nel *brain aging*. A lungo si è ritenuto che la spiegazione di questo processo fosse la morte dei neuroni, che essendo cellule terminalmente differenziate, non possono essere sostituiti. Nell'invecchiamento del cervello si verifica una perdita del 2-4% del numero totale di neuroni, ma questo giustifica al massimo il 10% della riduzione volumetrica, sulla quale devono necessariamente incidere altri processi (von Bartheld, 2018). I meccanismi di degenerazione comprendono: la contrazione volumica dei somi neuronali, la degenerazione del neuropilo, la de-arborizzazione della rete dendritica e la conseguente perdita di sinapsi. Questi, con particolare riguardo per la degenerazione delle strutture dendritiche e la conseguente riduzione nel numero di sinapsi, impattano significativamente sulle capacità cognitive del cervello, spiegando la loro riduzione nella tarda età. I segni di degenerazione elencati sono stati osservati dapprima tramite studi su primati e in seguito confermati su modelli umani di *brain aging*. Le aree in cui si è osservato maggiore danno a carico dei dendriti neuronali sono le cortecce prefrontale, precentrale e temporale superiore, la riduzione della lunghezza media delle terminazioni dendritiche è

stata misurata tra il 9 e l'11%, mentre la densità di spine dendritiche ha subito variazioni molto più vistose, intorno al 50% (Jacobs et al., 1997).

A livello di sostanza bianca, i meccanismi di danno più evidenti sono la degenerazione strutturale delle terminazioni assoniche e la demielinizzazione. La struttura tridimensionale della sostanza bianca è indagata con tecniche di *imaging* con tensore di diffusione (DTI, *Diffusion Tensor Imaging*), attraverso cui è possibile calcolare il valore di quattro indicatori utilizzati per definire l'integrità del tessuto. Il primo di questi è l'anisotropia frazionaria (FA), che stima il grado di anisotropia del processo di diffusione delle molecole d'acqua lungo gli assoni mielinizzati rispetto alla diffusione nello spazio extracellulare. In seguito, si definiscono la diffusività media (MD) che rappresenta la grandezza complessiva del processo di diffusione, la diffusività assiale (AD) e la diffusività radiale (RD), che rappresentano, rispettivamente, le componenti del processo diffusivo coerenti con la direzione dei terminali assonici o disposte radialmente rispetto a questi. I dati disponibili suggeriscono un aumento progressivo nei valori di questi descrittori, con un tasso che cresce all'aumentare dell'età degli individui presi in esame e, dunque, seguendo l'invecchiamento del cervello. Queste alterazioni sono particolarmente visibili in aree critiche dell'encefalo, ad esempio le aree talamiche posteriori e le aree medio-ippocampali, ove uno studio del 2013 ha misurato ratei importanti di incremento per AD e RD (Kumar et al., 2013). L'aumento dei valori di diffusività è segno di degenerazione assonica e degradazione della guaina mielinica. Si osserva riduzione di diametro dei terminali neuritici, perdita di densità delle fibre e mancanza di coerenza nella direzione di trasmissione tissutale dei segnali. Il fenomeno è più spiccato in assoni di piccolo diametro e dotati di guaine mieliniche più leggere, mentre gli assoni più spessi risultano meno sensibili (Stahon et al., 2016). Nella vita adulta si osserva una riduzione della lunghezza totale delle fibre mielinizzate del 10% su base decennale tra i 20 e gli 80 anni di età (Marner et al., 2003). La guaina mielinica degli assoni è prodotta dagli oligodendrociti, che formano multipli avvolgimenti attorno alle fibre neuritiche, rivestendole e degrada a causa della morte di questi. Gli oligodendrociti sono particolarmente sensibili a diversi meccanismi di danno cronico, come ischemia cronica da ipo-perfusione, tossicità immuno-mediata della microglia, eccitotossicità glutammatergica e tossicità indotta dall'accumulo di ioni ferro. L'applicazione della tecnica FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*) permette di migliorare la lettura delle immagini ricavate dalla risonanza magnetica nucleare del cervello, sopprimendo i segnali di disturbo dovuti alla presenza del liquor cerebrospinale e rendendo molto più visibile il parenchima della sostanza bianca. In questo modo si evidenziano zone di concentrazione di danno note come *White Matter Hyperintensities* (WMHs), che appaiono come lesioni molto luminose, comuni nei soggetti al di sopra dei 60 anni di età ed associate a problematiche vascolari, tra cui ostruzione vasale, infarto e micro-ictus (Fazekas et al., 1998; Salat et al., 2004; Wardlaw et al., 2015). Per questo le WMHs sono legate a fattori di rischio cardiovascolare come il fumo, il diabete e l'ipertensione arteriosa (Habes et al., 2016; Wardlaw et al., 2019). Spesso le WMHs sono zone di gliosi reattiva dove, a seguito di danno da ipo-perfusione, viene depositato materiale

cicatrizziale. Le WMHs si distinguono in base alla loro localizzazione, in forme peri-ventricolari e profonde. Le WMHs peri-ventricolari si manifestano come discontinuità del rivestimento ependimale del ventricolo, con degenerazione delle fibre di sostanza bianca e demielinizzazione nelle zone attorno ai vasi sanguigni, segue una profonda gliosi. Le aree più colpite sono i corni anteriore e posteriore dei ventricoli (Fazekas et al. 1987), dove si formano punti di discontinuità della parete in cui si infila il liquor cerebrospinale, con conseguente infiammazione del tessuto. Le forme profonde mostrano una minore presenza di gliosi, con più forte degenerazione delle fibre assoniche e delle guaine mieliniche nelle aree peri-vascolari. Hanno una localizzazione variabile e diffusa, associata ad aree ipossiche a causa di danno nella struttura dei piccoli vasi encefalici, micro-ictus o sanguinamento (Fernando et al., 2006; Griffanti et al., 2018). Il volume totale delle WMHs cresce nell'invecchiamento, con un tasso diverso nelle due tipologie, più rapido è l'aumento delle alterazioni peri-vascolari che guadagnano un 12% su base annua, mentre per le alterazioni profonde si stima un aumento annuo del 7% (Nyquist et al., 2015). Le principali alterazioni strutturali del tessuto della sostanza bianca sono riassunte in Figura 2.

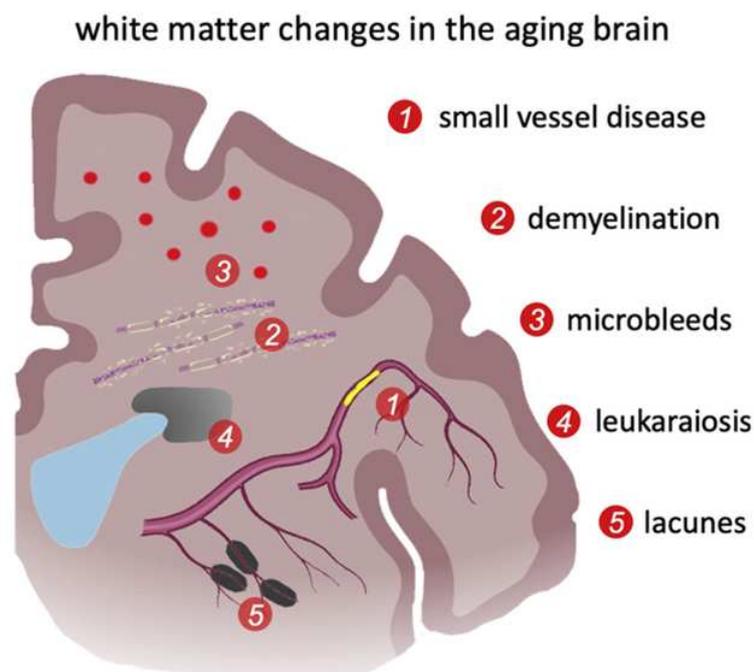


Figura 2: Principali alterazioni nella struttura della sostanza bianca encefalica che si osservano nei processi di *brain aging* (Blinkouskaya et al., 2021).

I sistemi fluidi coesistenti a livello encefalico sono essenzialmente tre: il liquido interstiziale del tessuto nervoso, il liquor cerebrospinale ed il sangue circolante nel letto vascolare dell'organo, questi tre distretti fluidi interagiscono tra di loro, attraverso un opportuno scambio di molecole, che è regolato da un lato dalla barriera emato-encefalica (BEE) e dall'altro dai plessi coroidei dei ventricoli. I plessi coroidei si

trovano presso i ventricoli laterali e sono costituiti da un singolo strato di cellule ciliate, che separano il lume ventricolare dal parenchima d'organo e sono deputate alla filtrazione del liquor cerebrospinale. Il plesso coroideo è formato da cellule strettamente adese le une alle altre, grazie all'azione di giunzioni strette, il passaggio di acqua è regolato dalla presenza di acquaporine di tipo 4 (AQP4) e tutta la struttura si comporta da barriera bidirezionale nello scambio di sostanze tra il liquido interstiziale ed il liquor. La barriera emato-encefalica è composta da vari strati, tra cui il primo è formato da cellule endoteliali, è continuo e molto compatto; essa regola in modo molto rigido lo scambio di sostanze tra il sangue ed i fluidi interstiziali del cervello. La struttura della BEE sarà trattata in modo molto più approfondito nel prosieguo di questo lavoro, cui si rimanda per approfondimento (Paragrafo 1.6). I fenomeni di *brain aging* comportano l'alterazione delle funzionalità di questi distretti, cui consegue una perdita dell'equilibrio omeostatico dei liquidi circolanti a livello encefalico, con riduzione dell'eliminazione delle sostanze di scarto e possibile ingresso nel SNC di molecole ad azione tossica o pro-infiammatoria. Questo processo avviene, ad esempio, per i plessi coroidei, che subiscono cicli di stiramento e micro-lacerazione a causa della variazione nel volume dei ventricoli (Shook et al., 2014; Todd et al., 2018). La loro riparazione causa deposizione di materiale cicatriziale e diminuisce l'integrità della parete. A causa della progressiva rovina dei plessi coroidei, la secrezione di liquor cerebrospinale cala progressivamente nell'invecchiamento.

Una condizione tipica dei processi di invecchiamento cerebrale è la malattia dei piccoli vasi encefalici. Si tratta di una definizione generica nella quale ricadono tre processi patologici a carico della rete vascolare dell'encefalo, molto comuni in tarda età: l'aterosclerosi intracranica, l'arteriosclerosi cerebrale e l'angiopatia amiloide cerebrale (CAA). Nell'arteriosclerosi cerebrale si osserva un ispessimento ed un indurimento della parete arteriosa, con conseguente perdita di elasticità dei vasi. L'aterosclerosi intracranica è causata dalla deposizione di colesterolo a livello arterioso, con conseguente stenosi, associata a riduzioni o alterazioni di perfusione d'organo, questa patologia colpisce comunemente i vasi di maggior dimensione, in particolare quelli del poligono di Willis. L'angiopatia amiloide cerebrale si osserva tipicamente al di sopra dei 65 anni di età, a causa della deposizione di proteina beta amiloide presso le pareti vasali dell'encefalo. Essa comporta ispessimento delle pareti associato a perdita della componente muscolare liscia, da cui deriva una notevolissima suscettibilità alla rottura. I fenomeni di *brain aging* colpiscono anche i vasi venosi e le venule, ove si osserva deposizione parietale di eccessi di collagene, aumento di spessore ed irrigidimento, restrizione del lume vasale, diminuzione del flusso ematico e riduzione delle capacità di eliminazione degli scarti metabolici. Tali difetti vascolari possono danneggiare il tessuto cerebrale circostante, dove si osserva la comparsa di microsanguinamenti e lacune. I microsanguinamenti si sviluppano a livello del talamo e dei gangli basali, come conseguenza della rottura dei vasi, dovuta ad angiopatia amiloide cerebrale od a vasculopatia ipertensiva. Le lacune, invece, si sviluppano a livello della sostanza bianca ed in prossimità dei gangli della base, sono piccole cavità riempite di liquor cerebrospinale che si formano in seguito ad infarto od emorragia dei vicini capillari, la loro dimensione varia tra i 3 ed i

15 mm (Mustapha et al., 2019).

1.3 PROCESSI CELLULARI E MOLECOLARI DI DANNO

Verranno ora analizzati i processi biochimici su cui si basano le alterazioni strutturali e tissutali messe in evidenza in precedenza. I meccanismi cellulari più importanti sono: disfunzione dei mitocondri neuronali, accumulo intracellulare di derivati ossidati di proteine, lipidi e acidi nucleici, danno a carico dei meccanismi di autofagia e dei proteasomi con conseguente ridotta capacità di eliminazione dei rifiuti cellulari, alterata omeostasi dello ione calcio, compromissione nei meccanismi di risposta allo stress, alterata connettività delle reti neuronali, infiammazione e deregolazione del metabolismo energetico. Questi segni distintivi dei processi di invecchiamento del cervello sono stati messi in evidenza da tempo e sono comunemente definiti con il termine di *hallmarks of aging*. Di seguito è esposta una descrizione sintetica di questi fenomeni, ad eccezione dell'ultimo, cui sarà dedicata una trattazione più ampia ed approfondita nel paragrafo successivo. Sarà evidenziato come a processi che riguardano direttamente i neuroni, si aggiungono meccanismi di degenerazione a carico delle cellule gliali, in particolare la riduzione della lunghezza dei telomeri e la senescenza, che sembra impattino nei fenomeni di *brain aging*, anche se in modo non del tutto chiaro. La Figura 3 riassume le alterazioni biochimiche visibili nel SNC.

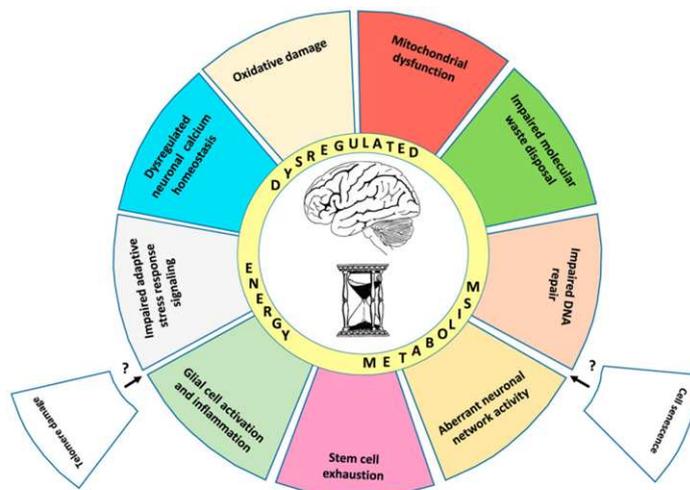


Figura 3: Schema riassuntivo dei processi cellulari fondamentali che si osservano nell'invecchiamento dell'encefalo, a livello di neuroni e cellule gliali, noti con il termine di *hallmarks of brain aging* (Mattson and Arumugam, 2018).

ANOMALIE MITOCONDRIALI

I mitocondri hanno multiple funzioni regolatorie su processi fondamentali per la vitalità e la funzionalità cellulare, per questo una compromissione della loro attività impatta sulla cellula in modo molto negativo. La prima funzione dei mitocondri è la produzione di energia; a livello mitocondriale si sviluppano le

principali vie cataboliche eucarioti, cioè il ciclo di Krebs e la catena di trasporto degli elettroni. Quest'ultima sostiene la produzione del gradiente elettrochimico utilizzato dal complesso della ATP-sintasi per la sintesi di ATP. L'ATP viene speso per sostenere la trasmissione elettrochimica ed i processi fondamentali per la sopravvivenza dei neuroni. Altre funzioni significative dei mitocondri sono: l'omeostasi del calcio, la regolazione dell'espressione genica ed il controllo dell'apoptosi. L'attivazione del processo di apoptosi inizia con l'assemblaggio, presso la membrana mitocondriale esterna, di complessi multi-proteici, noti come pori di transizione della permeabilità mitocondriale, che consentono la fuoriuscita dei fattori proteici solubili che regolano il processo. Nel tessuto di un cervello invecchiato si osservano alterazioni morfologiche tipiche a carico dei mitocondri, come l'aumento in numero e la frammentazione, la depolarizzazione delle membrane e l'ossidazione del DNA mitocondriale (Stahon et al., 2016; Morozov et al., 2017). Il processo di mitofagia, cioè la degradazione dei mitocondri non funzionanti, perde di efficacia, a causa dell'ossidazione della parkina a livello di un suo residuo solforilato e la conseguente compromissione nell'attività di questa proteina regolatrice del processo (questa via sarà approfondita più avanti al Paragrafo 1.7). Tra le alterazioni conseguenti è possibile citare la perdita di efficienza della catena di trasporto degli elettroni, la riduzione nella capacità di controllo delle concentrazioni di calcio e la diminuzione della soglia di attivazione dei processi di apoptosi. Infine, la compromissione nella produzione di NADH, altera il rapporto cellulare tra la forma ridotta e quella ossidata del cofattore, impedendo la corretta funzionalità di alcuni enzimi vitali per il neurone, tra cui le istone-deacetilasi della famiglia delle sirtuine, che saranno citate anche in seguito parlando di alterazioni della regolazione genica (Fang et al., 2017).

STRESS OSSIDATIVO

Il SNC è particolarmente soggetto allo stress ossidativo poiché ivi sussistono numerosi processi che producono specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto, in particolare in forma di ossido nitrico NO e di radicale perossinitrito ONOO^- . Le vie più problematiche sono la respirazione cellulare, l'attività delle ossidasi, la reazione di Fenton catalizzata dagli ioni ferro(II) e rame(II), le reazioni di ossidazione dei derivati azotati catalizzate dallo ione calcio (Halliwell, 2001). Normalmente, la prima specie reattiva ad essere prodotta è l'anione superossido O_2^- che deriva dall'attività della catena di trasporto degli elettroni quando vi è eccesso di ATP e riduzione nel trasporto di elettroni. In queste condizioni si verifica una riduzione incompleta dell'ossigeno che, invece di essere convertito in acqua, forma il superossido (Sinha et al., 2013). La formazione di superossido è principalmente imputabile alla funzione dei complessi I e III della catena respiratoria, ma a livello del cervello è proprio il complesso I ad esserne interamente responsabile (Barja, 1999). Successivamente, la superossido dismutasi converte il superossido in perossido di idrogeno e questo subisce reazione di Fenton, formando un'equivalente di anione idrossido, poco problematico ed un equivalente di radicale idrossido, ad altissima reattività. Si veda lo schema in Figura 4 che riassume le modalità di produzione e detossificazione mitocondriale dei ROS. I ROS possono ossidare diversi substrati biologici a livello cellulare, provocando disfunzioni di vario genere, ad esempio il danno ROS-mediato dei

complessi della catena respiratoria può favorire un'anomala produzione di ulteriori ROS, innescando un ciclo vizioso. L'attività ossidante può comportare danno in diversi distretti, devono essere sottolineati in particolare la perossidazione lipidica delle membrane ed il danno delle strutture proteiche ivi presenti, tra cui i trasportatori del glucosio, i recettori per fattori di crescita neurotrofici ed i trasportatori ionici ATP-dipendenti. Il 4-idrossinoneale o HNE è un comune derivato di perossidazione lipidica, osservato su tessuti encefalici animali. L'HNE è in grado di addurre alle proteine a livello di residui di cisteina, lisina o istidina, comportandone l'alterazione funzionale e strutturale (Guix et al., 2005; Mattson, 2009; Perluigi et al., 2014). Anche gli acidi nucleici sono seriamente sensibili al danno da ROS, questo vale in particolare per il DNA mitocondriale, che non è protetto dalle proteine istoniche ed ha un elevato tasso di mutazione, ma anche per il DNA genomico. Lo stress ossidativo impatta sulla regolazione epigenetica, diminuendo il livello di metilazione del DNA, attraverso l'ossidazione di alcune basi, alterando la struttura delle proteine istoniche e diminuendo l'attività degli enzimi che regolano queste ultime, per deplezione di alcuni cofattori essenziali.

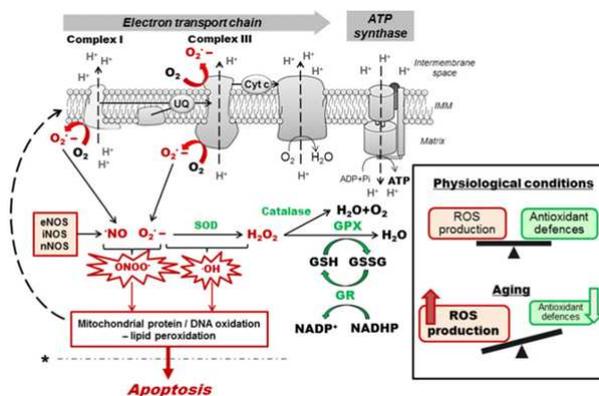


Figura 4: Rappresentazione schematica dei principali processi mitocondriali che comportano la produzione di ROS e delle relative strategie di detossificazione (Grimm and Eckert, 2017).

DISFUNZIONE DEI PROCESSI DEGRADATIVI

L'accumulo di molecole aberranti è un tipico meccanismo di danno che si osserva nell'invecchiamento del cervello. Ad impattare sul livello di accumulo neuronale di molecole di scarto sono principalmente: il danno ossidativo a carico delle diverse famiglie di macromolecole biologiche, il calo nei processi di autofagia coinvolti nel *turnover* delle strutture cellulari invecchiate, tra cui gli organelli e la ridotta attività del sistema ubiquitina-proteasoma, nella degradazione delle proteine a struttura anomala.

Nell'autofagia, il materiale da degradare viene rinchiuso in una vescicola membranosa, detta autofagosoma, la quale si fonde con un lisosoma. Il lume vescicolare viene acidificato e si attivano gli enzimi litici lisosomiali, che ne degradano il contenuto. La degradazione proteica può avvenire anche attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma, in questo caso la proteina viene dotata di una coda di poli-ubiquitinazione

a livello di un residuo di lisina. Il proteasoma è un complesso macromolecolare proteico di grandi dimensioni, che riconosce le proteine poli-ubiquitinate, grazie alla subunità 19S regolatoria. La proteina riconosciuta viene trasportata all'interno del complesso, che ha una forma a barile e viene degradata dalla subunità 20S. Nel *brain aging* si osserva accumulo neuronale di autofagosomi non degradabili, alcuni dei quali pieni di lipidi e di proteine poli-ubiquitinate (Sulzer et al., 2008; Shimabukuro et al., 2016). La capacità di acidificazione luminare dei lisosomi cala, riducendo l'efficienza degli enzimi litici. L'attività dei proteasomi è compromessa, soprattutto presso corteccia frontale e ippocampo (Keller et al., 2000), aree particolarmente sensibili ai processi di invecchiamento. L'accumulo di proteine mal-funzionanti è un fenomeno tipico non solo dei processi di invecchiamento del cervello, ma anche di alcune patologie neurodegenerative. Gli accumuli cellulari di proteina beta-amiloide, per esempio, si ritrovano anche nei soggetti sani a causa di fenomeni di *brain aging*, pur essendo un segno tipico di malattia di Alzheimer. Più raro è riscontrare in soggetti sani l'accumulo intracellulare di proteina tau, poiché questo processo, che consegue la formazione delle placche amiloidi, si associa normalmente ad una forte degenerazione delle funzioni cognitive.

OMEOSTASI DEL CALCIO

Il segnale calcio regola la funzionalità cellulare e la capacità di adattamento delle reti neuronali. L'aumento della concentrazione citoplasmatica di calcio nei neuroni è indotta dal neurotrasmettitore glutammato, per azione sui recettori ionotropici di tipo AMPA (recettori per l' α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolone propionato), che aumentano le correnti di sodio con effetto depolarizzante ed eccitatorio. Il calcio entra in cellula attraverso i propri canali voltaggio dipendenti ed i recettori NMDA (recettori per l'N-metil-D-aspartato) per il glutammato; in seguito, la sua regolare concentrazione viene ripristinata grazie alla funzione delle calcio ATP-asi della plasmamembrana e del reticolo endoplasmatico. L'aumento transiente dei livelli citoplasmatici di calcio attiva diverse proteine solubili della famiglia delle chinasi e delle fosfatasi, le quali regolano vari processi cellulari, tra cui l'espressione in membrana dei recettori glutammatergici, la sintesi proteica ed il rimodellamento del citoscheletro. Inoltre, una via di *signaling* profondo mediata dalla proteina CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*) regola l'espressione genica di fattori di plasticità sinaptica e adattamento tissutale allo stress (Mattson, 2012). Il controllo della concentrazione intracellulare di calcio peggiora nei fenomeni di invecchiamento, con generale aumento dell'eccitabilità cellulare, questo accade perché riduce la capacità del neurone di produrre iper-polarizzazione reattiva dopo la generazione di un potenziale d'azione e aumenta la permeabilità dei canali di tipo L di membrana al calcio. Si osserva una minore capacità di ritenzione di calcio a livello di reticolo endoplasmatico e mitocondri ed una riduzione nei livelli di secondi messaggeri che legano il calcio, con aumento delle concentrazioni basali dello ione (Thibault et al., 2001; Toescu et al., 2004; Gant et al., 2006; Porte et al., 2008). L'incremento della calcemia plasmatica provoca attivazione delle proteasi calcio-dipendenti e possibile innesco delle caspasi iniziatrici di apoptosi (Mattson, 2000; Nixon, 2013;

Fatokun et al., 2014).

MECCANISMI DI ADATTAMENTO

Le vie di biosegnalazione cellulare che intervengono nell'adattamento allo stress sono essenzialmente tre:

- La via mediata dalla AMPK (*5'-Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase*), una proteina sensibile ai livelli di disponibilità energetica della cellula, che si attiva quando aumenta il rapporto AMP/ATP. AMPK si occupa di fosforilare ulteriori proteine effettrici che regolano diversi processi di adattamento cellulare, a livello di catabolismo energetico, autofagia ed eccitabilità neuronale, agendo su vari bersagli molecolari, tra cui i trasportatori del glucosio ed il fattore mTOR. (Weisovà et al., 2009; Ikematsu et al., 2011; Lin and Hardie, 2018; Shah et al., 2017)
- La via attivata dal complesso calmodulina-ione calcio, che agisce sul fattore CREB ed sul fattore di trascrizione nucleare NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e prosegue in un complesso *pathway* che coinvolge l'attivazione della NO-sintasi del SNC. L'NO prodotto attiva un'isoforma solubile di guanilato ciclasi, riducendo i processi di eccitotossicità e stress metabolico a carico del neurone. (Cohen et al., 2015; Saura and Cardinaux, 2017; Snow et al., 2014; Knott et al., 2017)
- La via attivata da proteine sensibili ai ROS, che conduce nuovamente alla stimolazione del fattore NF- κ B e di un altro fattore di trascrizione nucleare noto come NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2*). (Shih et al., 2005; Marosi et al., 2016)

I fattori di trascrizione attivati nelle tre vie aumentano l'espressione di geni coinvolti nella riduzione dello stress cellulare, nella riparazione e nell'eliminazione di molecole danneggiate, tra cui fattori neurotrofici (BDNF, *Brain Derived Neurotrophic Factor*), enzimi di riparazione del DNA (APE1, *apurinic/aprimidinic endonuclease 1*), enzimi antiossidanti (Superossido-dismutasi 2, Eme-ossigenasi-1, Chinone-ossidoreduttasi-1), proteine antiapoptotiche (Bcl-2, da *B-cell lymphoma*) e regolatori del segnale calcio (calbindina) (Yang et al., 2010, 2014; Sullivan et al., 1999; Mattson and Meffert, 2006; Son et al., 2010). Queste vie subiscono un calo di efficacia nei processi di invecchiamento, esponendo i neuroni a danno e processi neurodegenerativi. Nel cervello invecchiato si osserva una sottoproduzione di fattori neurotrofici ed un generale peggioramento delle difese antiossidanti. L'iperattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e la conseguente produzione di cortisolo hanno un effetto peggiorativo sulla secrezione di BDNF (McEwen and Morrison, 2013). A livello dell'ippocampo, studi su modello animale hanno evidenziato una netta riduzione della produzione di NO accompagnata da deficit cognitivi significativi, che migliorano ripristinando l'attività della NO-sintasi (Zhang et al., 2017).

ANOMALIE DELLE RETI NEURONALI

Il tipico neurone glutammatergico corticale presenta un lungo assone ed un ampio albero dendritico, e può trasmettere verso altri neuroni glutammatergici o GABAergici, nel primo caso in senso eccitatorio e nel secondo con azione inibitoria. A livello di albero dendritico, le sinapsi dei neuroni glutammatergici si collocano in posizione distale, mentre le sinapsi GABAergiche agiscono sui dendriti prossimali o sul soma neuronale. I segnali regolatori provenienti dai nuclei monoaminergici, di tipo serotoninergico, noradrenergico e dopaminergico o colinergici agiscono vicino alle sinapsi glutammatergiche. La struttura descritta è visibile in Figura 5. L'integrità e la corretta connessione tra i neuroni è essenziale per il normale funzionamento della corteccia, mentre una compromissione si osserva nei fenomeni di invecchiamento. Il segno tipico è la ridotta trasmissione GABAergica, in particolare di tipo $GABA_A$ e la conseguente iper-eccitazione centrale che può degenerare in fenomeni di eccitotossicità (Heise et al., 2013; Richardson et al., 2013; McQuail et al., 2015; Porges et al., 2017). In caso di compromissione dei neuroni monoaminergici o colinergici, essi hanno ruoli chiave nei processi di apprendimento, memorizzazione, decisione e regolazione dell'umore, dunque possono comparire perdite cognitive e depressione. Una eccessiva eccitazione dei neuroni ippocampali impatta negativamente sulla salute dell'organo, risultando associata alla riduzione del volume della sostanza grigia. Un minore livello di stimolazione eccitatoria, definito da una ridotta espressione di geni coinvolti nella risposta a tali segnali, migliora l'efficienza di trasmissione neuronale e conduce ad un invecchiamento equilibrato dell'organo. Il meccanismo molecolare coinvolge il repressore di trascrizione nucleare REST (*Repressor Element 1-Silencing Transcription factor*), che agisce modulando l'attività di geni coinvolti nella funzionalità sinaptica e nella comunicazione corticale. REST interviene a livello epigenetico modificando alcuni istoni ed la morfologia della cromatina ed è un messaggero intracellulare attivato in risposta a molti meccanismi di stress (Buffolo et al., 2021; Hwang and Zukin, 2018; Lu et al., 2014; Pecoraro-Bisogni et al., 2018).

Un altro elemento cardine nell'alterazione delle reti neuronali è la perdita di connessione funzionale dei neuroni costituenti il *Default Mode Network* (DMN). Si tratta di una rete che si attiva quando l'individuo non interagisce con l'ambiente, la quale ha un profondo impatto nella capacità di ricordare il passato e prevedere le conseguenze future degli eventi. Questa rete comprende la regione del precuneo, sita nel lobo parietale, la corteccia cingolata posteriore del sistema limbico, la corteccia prefrontale mediale e la circonvoluzione angolata. Il meccanismo molecolare attraverso cui la connessione tra queste aree degenera non è noto, ma si pensa che danni a questo livello possano comportare un decadimento delle funzioni cognitive dell'individuo (Leal and Yassa, 2013; Sala-Llomch et al., 2015). L'attivazione di reti di comunicazione neuronale atipiche è un fenomeno comune nel *brain aging*, si pensa che queste abbiano un significato compensatorio, riuscendo a mantenere l'efficacia di alcune funzioni cognitive nonostante la degenerazione progressiva della sostanza grigia corticale. Per esempio, negli individui più anziani aumentano i collegamenti con le aree di corteccia che si occupano delle abilità di lettura e della

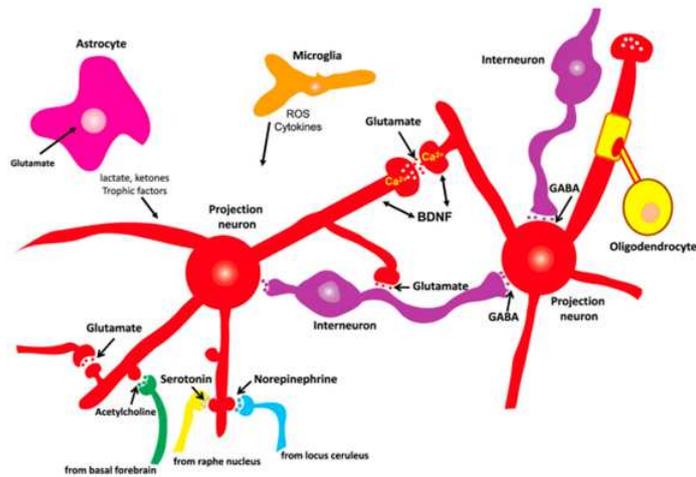


Figura 5: Circuito neuronale di base del cervello umano e relativa componente gliale di supporto (Mattson and Arumugam, 2018).

memoria procedurale, con potenziamento di queste funzioni. Un altro esempio prevede l'attivazione della corteccia rinale del lobo temporale per compensare la degenerazione ippocampale ed evitare la perdita della memoria (Cappell et al., 2010; Deselaar et al., 2006; Fitzhugh et al., 2019).

SISTEMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

Il danno ossidativo del DNA è un fenomeno noto e ben descritto nei neuroni, sia a causa della forte presenza centrale di ROS, la cui produzione segue l'attività eccitatoria ed eccitotossica del neurotrasmettitore glutammato, sia per la scarsa capacità delle difese antiossidanti locali. Il danno genomico ROS-mediato può svilupparsi attraverso vari meccanismi: creazione di siti apurinici od apirimidinici per la caduta di una base, ossidazione delle basi, rotture a singolo ed a doppio filamento, di cui questi ultimi rappresentano la forma più problematica, difficilmente riparabile e spesso connessa a danneggiamenti irreversibili del genoma (Shanbhag et al., 2019; Thanan et al., 2014). La riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA è mediata dalla presenza dell'istone trimetilato H3K9me3, che mostra un incremento progressivo nella tarda età. Un aumento nell'espressione di questa proteina sembra connesso ad un deterioramento delle capacità cognitive, si pensa si tratti di un meccanismo di adattamento compensatorio (Suberbielle et al., 2013). Il danno a carico del DNA genomico si concentra in regioni promotoriali di particolari geni, che mostrano una progressiva sotto-regolazione a partire dai 40 anni di età e con picco oltre i 70. Questi geni sono spesso legati alla plasticità sinaptica, al funzionamento del distretto mitocondriale e al trasporto vescicolare, oppure sono geni coinvolti in risposte compensatorie contro l'invecchiamento, come quelli che regolano il *foldig* proteico, la detossificazione dei ROS e l'omeostasi dei metalli (Lu et al., 2004). La riparazione per escissione di base (BER, *Base Excision Repair*) viene utilizzata per correggere varie tipologie di danno genomico, tra cui le rotture a singolo filamento. Il sistema BER richiede l'inter-

vento di una glicosidasi che riconosce la base aberrante, di un'endonucleasi che esegue l'escissione e di una polimerasi che ripristina la struttura corretta del filamento. L'endonucleasi coinvolta è la proteina APE1, già citata come fattore di adattamento allo stress (Leandro et al., 2015). La disfunzione dei sistemi riparativi per escissione di base spiega l'aumento delle rotture genomiche a singolo filamento che si osserva in modo rilevante in alcune aree critiche dell'encefalo, tra cui l'ippocampo, lo strato granuloso dell'encefalo e quello del cervelletto.

Un secondo sistema di interesse coinvolge le proteine ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) e ATR (*ATM and Rad3-related protein*), sensori di funzionalità del *pathway* di biosegnalazione indotto dal danno genomico. In questa via ha un ruolo anche l'istone H2AX, che, in risposta a danno del DNA, viene fosforilato a γ -H2AX. Lo scopo di questo meccanismo è monitorare lo stato di salute del genoma, arrestando il ciclo cellulare quando sia rilevata la presenza di danno e procedendo alla sua risoluzione. L'attività delle proteine ATM ed ATR si esplicita nell'attivazione di specifiche chinasi proteiche, note come *Checkpoint Kinase 1 e 2* (Chk1/Chk2), che sono gli esecutori finali dell'arresto del ciclo cellulare. Nello specifico, la coppia ATM-Chk2 è responsabile della rilevazione e riparazione delle rotture a singolo filamento, mentre in caso di rotture a doppio filamento intervengono ATR-Chk1 (Buscemi et al., 2004). Il ruolo di ATM comprende anche l'attivazione per fosforilazione di p53, la cui funzione nella stabilizzazione del genoma e nella prevenzione dell'accumulo di mutazioni è estremamente noto, tanto da essere stata definita come "guardiano del genoma". In forma fosforilata, p53 migra nel nucleo e favorisce la trascrizione della chinasi dipendente da ciclina p21, che contribuisce all'arresto del ciclo cellulare (Strachan and Read, 2004).

INFIAMMAZIONE

Esistono profonde evidenze che collegano l'invecchiamento cerebrale a fenomeni di tipo infiammatorio, nel cui sviluppo impattano in modo significativo le cellule gliali, in particolare microglia e astrociti. La microglia è composta da cellule ubiquitarie nel SNC, che modulano l'immunità innata; esse pattugliano il tessuto nervoso alla ricerca di patogeni o detriti cellulari, grazie alla presenza di processi cellulari ad elevata motilità. Le cellule della microglia hanno anche funzioni di mantenimento della plasticità neuronale, sostegno nei processi di rimodellamento delle sinapsi e secrezione di fattori neurotrofici. Queste cellule tendono ad attivarsi in maniera inopportuna nel cervello di pazienti anziani con sviluppo di una forte attività pro-infiammatoria. Tra i fattori secreti dalla microglia si ricordano le interleuchine 1 e 6 (IL-1 β , IL-6) ed il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor- α*) (Cribbs et al., 2012; Norden and Godbout, 2013). Altri meccanismi di infiammazione sono l'attivazione della cascata dei fattori del complemento e l'induzione della NO-sintasi nel produrre NO con azione pro-ossidante (Arumugam et al., 2007; Shi et al., 2015; Hong et al., 2016; Okun et al., 2011). Molti di questi meccanismi non sono di per sé dannosi, essendo connessi, nella loro funzione fisiologica, a processi di neuroplasticità e risposta allo stress; tuttavia, la loro attivazione ingiustificata ed eccessiva danneggia il tessuto nervoso, provocando morte neuronale e degenerazione delle sinapsi. Gli astrociti hanno funzione di supporto e mantenimento

dell'omeostasi del tessuto nervoso; tuttavia, una riduzione nella loro attività può esacerbare i processi infiammatori appena descritti e peggiorare il danneggiamento del tessuto. Astrociti e microglia sono legati nell'innescare di un circolo vizioso in *feedback* positivo che aggrava il danno infiammatorio: gli astrociti potenziano l'azione infiammatoria delle cellule immunitarie, fino a scatenare il danno neuronale, con esposizione di detriti cellulari, che a loro volta potenziano la risposta microgliale. Nell'invecchiamento il fenomeno risulta facilitato, poiché le cellule gliali divengono più sensibili agli stimoli pro-infiammatori e secernono quantità basali maggiorate di citochine pro-infiammatorie. L'interazione tra cellule gliali e neuroni è ben visibile nell'invecchiamento dell'ipotalamo. L'ipotalamo degenera a causa dell'aumentata proliferazione di cellule della microglia e dell'iper-secrezione di TNF- α . La degenerazione dell'ipotalamo ricade sul controllo del sistema endocrino con anomala sotto-produzione del fattore di rilascio delle gonadotropine GnRH. Si tratta di un processo esemplificativo, che mostra quanto l'invecchiamento del cervello possa connettersi al decadimento di funzione di altri distretti corporei (Zhang et al., 2013). Si pensa che l'anomala attivazione delle cellule della microglia sia legata al meccanismo della senescenza cellulare. Le cellule senescenti accumulano alterazioni strutturali, tra cui riduzione nel numero e nella dimensione dei processi cellulari, aumento del volume somatico e rigonfiamento sferoidale, cessano di dividersi, manifestano resistenza all'apoptosi ed acquisiscono un potenziale pro-infiammatorio notevole. Inoltre, possono formare ammassi di cellule aberranti che comprendono anche neuroni degeneri e che contribuiscono alla destrutturazione del tessuto nervoso. Il ruolo della senescenza cellulare nei processi di *brain aging* sarà ripreso in seguito al Paragrafo 1.8.

Un altro processo che è attentamente indagato come possibile traino di degenerazione è il calo nella neurogenesi in alcuni specifici distretti. La gran parte dei neuroni è terminalmente differenziata, dunque se queste cellule muoiono non sono rimpiazzate. Questo non accade nelle aree del giro dentato dell'ipocampo e del bulbo olfattivo, dove si mantiene attivo un processo di genesi di nuovi neuroni a partire da cellule staminali ivi presenti. Queste aree sono coinvolte nella memoria, nell'apprendimento e nella comprensione dello spazio tridimensionale, oltre che nel senso dell'olfatto; dunque, una loro atrofia comporta un declino cognitivo importante (Ming and Song, 2011). Diversi meccanismi sembrano indurre il blocco della neurogenesi, tra cui l'infiammazione e l'accorciamento dei telomeri. I telomeri sono i margini non codificanti del DNA cromosomico, la cui lunghezza cala nel corso dei cicli di mitosi. Nel tempo, un eccessivo accorciamento dei telomeri può causare danno al DNA ed induzione di processi di senescenza cellulare o morte controllata (Zhang et al., 2016). Nelle aree di neurogenesi citate in precedenza, i neuroni di nuova differenziazione sono molto sensibili al danno telomerico e vengono facilmente eliminati con meccanismo di apoptosi, se le relative estremità cromosomiche risultano eccessivamente abbreviate (Cheng et al., 2007).

1.4 METABOLISMO ENERGETICO E SUE ANOMALIE

L'invecchiamento del cervello è comunemente accompagnato dalla deregolazione del metabolismo energetico, con particolare interesse per i processi catabolici di zuccheri e lipidi. Il legame tra benessere del cervello e catabolismo energetico ha una chiara motivazione evolutiva, poiché le vie metaboliche cerebrali si sono evolute in un'era in cui la scarsità di risorse era una problematica quotidiana. Lo stile di vita occidentale moderno, caratterizzato da una costante disponibilità di calorie, da un forte consumo di alimenti elaborati, ricchi di lipidi e zuccheri semplici e da una ridotta attività fisica rappresenta una pressione evolutiva del tutto nuova, con conseguenze spesso deleterie sulla salute generale dell'individuo. Il cervello consuma il 25% del glucosio impiegato a livello corporeo (Rossi et al., 2001), la maggior parte del quale viene degradato via glicolisi e seguente metabolismo mitocondriale per produrre energia, a supporto della regolare trasmissione sinaptica. Il metabolismo neuronale del glucosio comprende tre fasi chiave: la regolazione della disponibilità cellulare da parte dell'ormone insulina, il trasporto del glucosio in cellula attraverso i trasportatori GLUT ed il catabolismo molecolare. L'ossidazione del glucosio comincia dalla glicolisi a livello citoplasmatico, con produzione del piruvato. In seguito, il piruvato viene degradato nel mitocondrio, attraverso decarbossilazione ossidativa, ciclo di Krebs e catena di trasporto degli elettroni. Le alterazioni del metabolismo degli zuccheri che contraddistinguono il *brain aging* si sviluppano a carico di diverse proteine fondamentali in queste vie.

Il SNC è costituito da tessuto insulino-dipendente, dunque la sua capacità di utilizzare glucosio dipende dall'azione dell'insulina e di molecole ormonali correlate, come la somatomedina IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*). La sensibilità insulinica dei neuroni dipende essenzialmente da due fattori, da un lato l'optimum di produzione mitocondriale di H_2O_2 , dall'altro il livello di infiammazione dell'encefalo (Cheng et al., 2010; De Felice et al., 2014; Spielman et al., 2014). Il recettore per l'insulina è una tirosin-chinasi di membrana, il *binding* del substrato ne induce autofosforilazione-dimerizzazione ed attiva la funzionalità chinastica, la conseguenza più evidente è la fosforilazione di IRS-1 (*Insuline Receptor Substrate-1*) a livello di un suo residuo di tirosina. IRS-1 attiva la via di biosegnalazione rapida che comprende PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*). Questa chinasi agisce su diversi secondi messaggeri, ma principalmente sul fosfatidil-inositolo-4,5-bifosfato che viene convertito in fosfatidil-inositolo-3,4,5-trifosfato sulla plasmamembrana interna. Di conseguenza, viene attivata la protein chinasi di tipo B, detta PKB (*Protein Kinase B*) o AKT, che regola il metabolismo di carboidrati e lipidi. Una seconda via, più lenta, comprende il fattore citosolico Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) che attiva a cascata la via delle MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), con conseguenze a lungo termine su crescita cellulare, differenziamento e sintesi proteica (una rappresentazione schematica di questa via è visibile in Figura 6). L'aspetto più significativo di alterazione di questa via è la ridotta funzionalità di IRS-1. La quantità di IRS-1 tirosin-fosforilato cala a scapito di un aumento nei livelli di IRS-1 serin-fosforilato (Moloney et al.,

2010; Yarchoane et al., 2014). L'insulinorestenza è significativamente associata al declino cognitivo che si osserva nel *brain aging* ed in alcune patologie degenerative (Kato et al., 2016), mentre una corretta sensibilità del neurone all'insulina, una normale concentrazione plasmatica dell'ormone ed una biosegnalazione intracellulare bilanciata conducono ad un invecchiamento fisiologico, in cui sono preservate le funzioni del cervello.

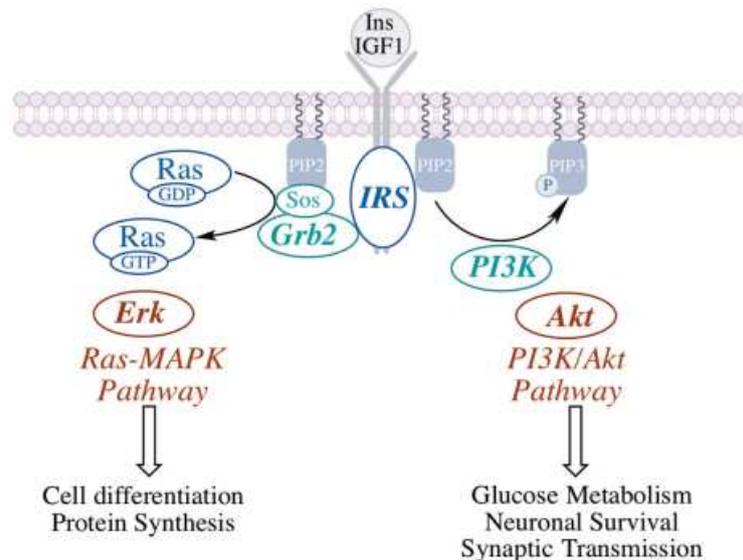


Figura 6: Schema delle principali vie di biosegnalazione attivate dal legame dell'insulina e del fattore di crescita IGF-1 ai propri rispettivi recettori, note con il termine di IIS (*Insulin/IGF1 Signaling*) (Yin et al., 2016).

L'ingresso del glucosio nelle cellule del SNC sfrutta i trasportatori GLUT, il glucosio accede all'endotelio vasale via GLUT1 e viene captato dai neuroni con meccanismo diretto mediato dal GLUT3 o indirettamente, attraverso gli astrociti che esprimono il recettore GLUT1 (Cunnane et al., 2011). Nel *brain aging* l'espressione neuronale del GLUT3 mostra un calo molto significativo poiché la proteina è sensibile a meccanismi di danno ossidativo, come la formazione di addotti con HNE, anche i livelli del trasportatore GLUT4, il cui ruolo è più marginale, calano vistosamente (Mark et al., 1997; Mattson, 2009). A livello astrocitario, invece, si verifica un cambiamento metabolico verso il consumo di glucosio, con aumentata espressione dei GLUT1 (Jiang et al., 2013). Queste modificazioni sono legate ad una serie di meccanismi di danno, tra cui l'assottigliamento dello strato corticale, la perdita di densità della materia grigia dell'encefalo e l'allargamento del solco cingolato, il tutto conduce alla riduzione delle performance dell'organo (Salat et al., 2004; Sowell et al., 2003; Kochunov et al., 2005).

Per concludere, si osservano alterazioni significative anche nel metabolismo mitocondriale del piruvato. Il piruvato viene convertito in acetil-CoA per azione della piruvato deidrogenasi, l'acetil-CoA entra nel ciclo di Krebs dove lega l'ossalacetato a formare una molecola di citrato, il ciclo degrada parzialmente

il citrato in una serie di passaggi, fino a ripristinare l'ossalacetato, producendo equivalenti di potenziale riducente in forma di NADH. Il potenziale riducente viene liberato nella catena di trasporto degli elettroni, convertendolo in un gradiente elettrochimico, che sostiene la funzionalità del complesso della ATP-sintasi, come già visto in precedenza. Il metabolismo mitocondriale ha una primaria funzione di produzione di ATP, processo che impegna il 90% del glucosio utilizzato a livello neuronale (Mangialasche et al., 2010), tuttavia il ciclo di Krebs viene sfruttato anche per sintetizzare alcuni metaboliti con ruoli importanti a livello del SNC, come glutammato, glutammina, GABA, aspartato. In modelli animali di *brain aging* si osserva un calo nel metabolismo mitocondriale circa del 30%, ancora una volta compensato da un aumento del metabolismo delle cellule gliali (Jiang et al., 2014; Boumezbeur et al., 2010; Hyder et al., 2006). L'impiego del piruvato nella sintesi di neurotrasmettitori ed altre molecole cala, a ciò si aggiunge un rallentamento nella funzione della catena di trasporto degli elettroni, con disfunzioni significative soprattutto nei complessi I e IV (Bowling et al., 1993). Alterazioni metaboliche minori si osservano anche in altre vie, ad esempio aumenta il consumo neuronale di corpi chetonici, soprattutto acetoacetato e γ -idrossibutirrato, per compensare il calo nell'utilizzazione di glucosio (Cunnane et al., 2016). I parametri lipidici neuronali vengono alterati, con accumulo di ceramidi a lunga catena e di vescicole piene di lipidi non degradati, mentre calano i livelli di acidi grassi omega-3 nelle membrane dei neuroni (Cutler et al., 2004; Shimabukuro et al., 2016; Denis et al., 2013).

Le alterazioni del catabolismo energetico neuronale sono legate alla dieta e allo stile di vita del paziente. Le aberrazioni colpiscono maggiormente persone che seguono una dieta ricca di zuccheri semplici o di grassi saturi (Hariri and Thibault, 2010; Koopmans and Schuurman, 2015), oppure il cui stile di vita è particolarmente sedentario. Diversi studi svolti su modello animale confermano questa associazione, per esempio nei ratti alimentati con mangimi ricchi di zuccheri e grassi saturi si osserva una riduzione nella capacità cognitiva (Beilharz et al., 2014). In questi studi emerge la coesistenza di vari meccanismi di danno da invecchiamento tra quelli elencati nel precedente paragrafo, come la neuroinfiammazione e lo stress ossidativo. Un consumo calorico importante, inoltre, aumenta i livelli di cortisolo circolanti e questo, come già visto, deprime la produzione di fattori neurotrofici, tra cui il BDNF, con conseguenze negative sulle funzioni di plasticità sinaptica e neurogenesi dell'ippocampo (Stranahan et al., 2008a; Wosiski-Kuhn et al., 2014). Anomalie cellulari del tessuto nervoso colpiscono individui affetti da obesità, aumento di BMI, sindrome metabolica e diabete di tipo 2. In letteratura sono disponibili numerose evidenze a supporto di questa correlazione. In studi su topi obesi a causa dell'alterazione nel gene della leptina, si sono osservati degenerazione della sostanza grigia ippocampale e relativa riduzione nel numero di spine dendritiche (Stranahan et al., 2008a, 2008b).

REGOLAZIONE DEL METABOLISMO ENERGETICO

La specie reattiva dell'ossigeno più importante per la regolazione del metabolismo cellulare è il perossido di idrogeno, od acqua ossigenata (H_2O_2). Il perossido di idrogeno prodotto a livello mitocondriale deriva

dalla dismutazione dell'anione superossido, grazie all'attività dell'enzima superossido-dismutasi. Come già detto, la produzione incontrollata di ROS è causa di danno, poiché supera la capacità dei sistemi antiossidanti cellulari, con accumulo di specie ossidanti che danneggiano diverse strutture macromolecolari. Tuttavia, un'adeguata concentrazione citoplasmatica di perossido è importante per la fisiologia cellulare, rientrando nella regolazione di diverse vie di biosegnalazione, tra cui quelle che modulano la trascrizione genica nucleare ed il metabolismo citosolico. Ad esempio, la regolazione della sensibilità insulinica del tessuto cerebrale è modulata dalla produzione mitocondriale di H_2O_2 . La via di biosegnalazione del recettore insulinico viene attivata dalla normale presenza cellulare di H_2O_2 , nel fenomeno del *redox priming*, una cui rappresentazione schematica è visibile in Figura 7. Questo accade perché l'ossidazione di un particolare residuo di cisteina del recettore ne facilita la funzione di trans-autofosforilazione (Loh et al., 2009). Inoltre, l'ossidazione blocca i principali inibitori che agiscono su questa via, cioè le fosfatasi dell'amminoacido tirosina e la fosfatasi lipidica PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) (Elchebly et al., 1999). Livelli anormalmente alti di H_2O_2 hanno un'azione depressiva sulla via, perché ne attivano alcuni specifici percorsi inibitori (Iwakami et al., 2011). La regolazione dei livelli mitocondriali di H_2O_2 sfrutta principalmente il sistema delle perossiredoxine della tioredoxina-2 e secondariamente quello del glutatione; tra le perossiredoxine (Prx), le più rilevanti sono la Prx3 e la Prx5 (Peng et al., 2004). La Prx3 è tra i principali sistemi di detossificazione dell'acqua ossigenata, la cui attività a livello neuronale contribuisce a contenere fenomeni di iper-produzione di ROS, come quelli dovuti all'eccitotossicità del glutammato; Prx3 risente di alti livelli di H_2O_2 poiché può subire ossidazione a formare un derivato acido sulfonico non più attivo (Cox et al., 2009). Prx5 è meno selettiva per l'acqua ossigenata, tuttavia il suo contributo è importante perché non subisce inibizione ossidativa in ambiente ricco di ROS. Il sistema del glutatione fornisce un contributo secondario nella regolazione dei livelli di H_2O_2 , sono coinvolte le isoforme della glutatione perossidasi GPx1, collocata nella matrice mitocondriale e GPx4, situata nello spazio intermembrana (Dabkowski et al., 2008; Yoo et al., 2010). La deplezione del glutatione riduce la risposta antiossidante della cellula, esitando in una deregolazione del *signaling* ROS-mediato, con conseguente disequilibrio metabolico, questo accade spontaneamente nei fenomeni di invecchiamento, poiché è descritto un calo nei livelli di glutatione. In un anziano si osserva una diminuzione nella concentrazione cellulare di glutatione che può raggiungere il 30% (Wüllner et al., 1999; Mwyderman et al., 2007; Emir et al., 2011). I sistemi di regolazione della produzione di H_2O_2 convergono nel consumo del cofattore NADPH. Gli enzimi ad azione anti-ROS subiscono un'alternanza ciclica tra la forma ossidata e la forma ridotta. La conversione della forma ridotta in quella ossidata è accompagnata dalla degradazione di una molecola ossidante, mentre il ripristino della forma ridotta è accoppiato all'ossidazione del NADPH a formare $NADP^+$. Nelle cellule nervose, la produzione di NADPH segue svariate vie, ma la principale sfrutta l'enzima Nicotinammide-Nucleotide-Transidrogenasi (NNT) che produce NADPH a partire da $NADP^+$ impiegando NADH e sfruttando il potenziale elettrochimico ottenuto attraverso la catena di trasporto

degli elettroni. Questa via contribuisce per il 50% alla produzione di NADPH. In studi preclinici sui ratti si è osservata una progressiva riduzione nella funzionalità e nell'espressione di NNT, cui consegue una minor capacità di sostenere lo stress ossidativo (Rydström, 2006; Hoek and Rydström, 1988; Ghosh et al., 2014).

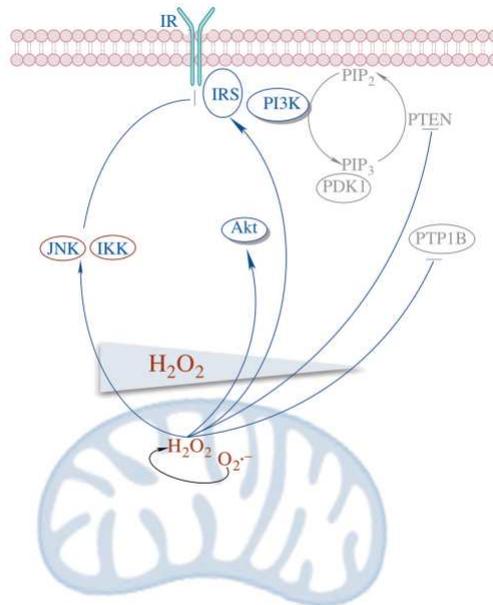


Figura 7: Vie di modulazione della risposta insulinica mediate dal perossido di idrogeno, a destra si possono osservare i meccanismi di attivazione promossi da concentrazioni contenute di perossido, mentre a sinistra sono indicati i meccanismi inibitori indotti dalle concentrazioni più elevate (Yin et al., 2016).

La deregolazione del metabolismo glucidico del neurone e l'alterata produzione di ROS si legano, nel processo dell'invecchiamento cerebrale, all'infiammazione latente di basso grado dell'encefalo. È noto che l'infiammazione cronica di basso grado può diminuire la risposta sistemica all'insulina, in particolare attraverso l'effetto del $TNF-\alpha$ che riduce la sensibilità del recettore all'ormone. Anche l' $IL-1\beta$ sembra agire in questa direzione, aumentando la produzione di $TNF-\alpha$. Non è noto se un simile meccanismo si verifichi anche nell'encefalo; tuttavia, nel *brain aging*, le alterazioni del metabolismo glucidico discusse in precedenza si associano a fenomeni infiammatori. La via di attivazione dei processi neuroinfiammatori è piuttosto complessa, ne saranno evidenziati alcuni aspetti particolarmente rilevanti ai fini di questo elaborato. La risposta infiammatoria viene innescata dall'attivazione di alcuni fattori di trascrizione, di cui il più importante è NF- κ B; ne deriva l'assemblaggio del complesso dell'inflammasoma e l'attivazione della procaspasi-1 zimogena ad enzima funzionante. Il fattore NF- κ B inattivo si trova in forma di complesso con il suo inibitore specifico I κ B, la fosforilazione di I κ B attiva, dunque, NF- κ B (Kabe et al., 2005). L'attività di NF- κ B dipende anche dal corretto bilanciamento del segnale redox dovuto all' H_2O_2 e sembra avere un

significato neuroprotettivo nei soggetti più giovani, mentre in tarda età è un fattore di tossicità cellulare (Patel et al., 2008), una sua rappresentazione schematica è riportata in Figura 8.

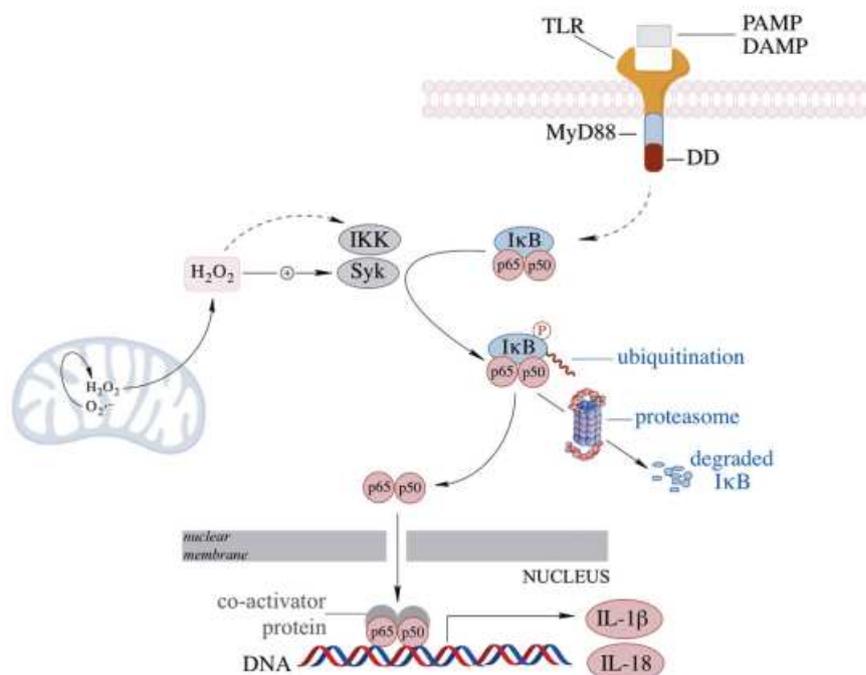


Figura 8: Schema sintetico della via di *signaling* di NF-κB e della sua regolazione (Yin et al., 2016).

Le conseguenze di attivazione della via di NF-κB sono l'aumento nella trascrizione genica di citochine e altre molecole coinvolte nella risposta immunitaria. L'iniziazione della via di NF-κB richiede, a monte, l'attivazione dei PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), di cui il più noto è il recettore TLR (*Toll-Like Receptor*), queste proteine riconoscono pattern molecolari tipici di micro-organismi patogeni (PAMPs) e di danni tissutali (DAMPs) mettendo in moto la risposta immunitaria innata. Tra le conseguenze dell'attivazione dei PRRs, vi è l'assemblaggio degli inflammasomi, responsabili della maturazione e del rilascio di citochine pro-infiammatorie, in particolare si verifica produzione di pro-interleuchina-1 e maturazione di questa in IL-1 β . Il complesso dell'inflammasoma comprende una serie di molecole, tra cui la caspasi-1 che viene attivata, la proteina adattatrice ASC (*Adaptor apoptosis associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain*) e una serie di proteine della famiglia di NLR (*Nod-Like Receptor*), di cui la più studiata nei processi neuroinfiammatori è NLRP3 (vedasi Figura 9). L'attivazione della proteina NLRP3 è un processo complesso, non completamente noto; tuttavia, sicuramente essa risente dei livelli cellulari di H₂O₂, che si comporta come un secondo messaggero. L'acqua ossigenata dissocia il complesso tra la tioredoxina e la TXNIP (*Thioredoxin-Interacting Protein*), la TXNIP, in forma libera, lega NLRP3 e la attiva, stimolando l'assemblaggio dell'inflammasoma (Hornung et al., 2008; Halle et al.,

2008; Spindel and Berk, 2012).

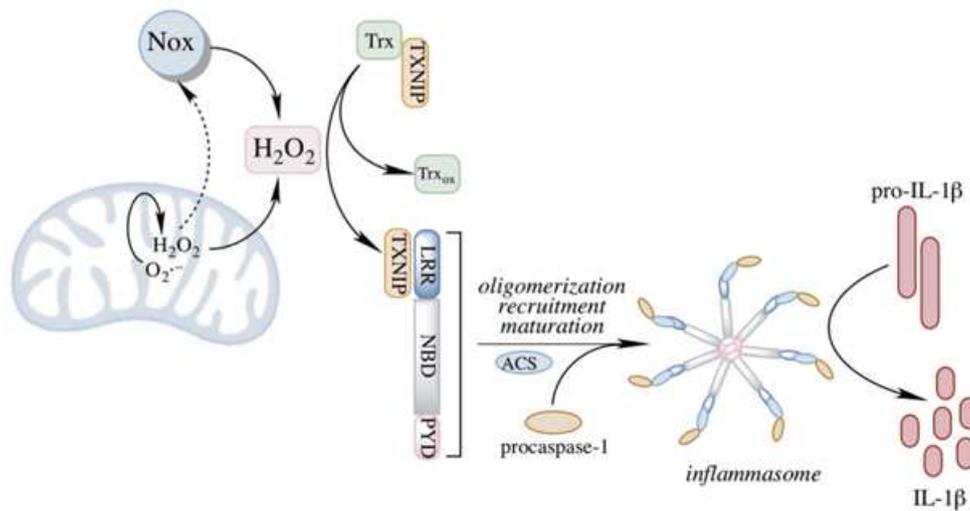


Figura 9: Via di attivazione mitocondriale dell'inflammasoma, comprendente il fattore NLRP3 e sua relazione con la produzione di perossido di idrogeno (Yin et al., 2016).

1.5 CARATTERISTICHE GENETICHE ED EPIGENETICHE

I processi degradativi che causano il *brain aging* e la neurodegenerazione sono sostenuti dalla *down-regulation* o dall'*up-regulation* di particolari geni, che possono mostrare una specificità per una certa regione del cervello, per una certa tipologia di cellula del SNC o per una certa fascia di età. Questi geni controllano processi chiave come l'attività neuronale e sinaptica, la risposta immunitaria ed infiammatoria, l'autofagia, la funzionalità dei lisosomi, la risposta allo stress, la regolazione delle vie di biosegnalazione cellulare e della morte programmata. I dati presentati in questa sezione riguardano particolari geni o famiglie di geni la cui deregolazione si associa a perdita di prestazione delle funzioni cognitive. Non sempre è semplice individuare il confine tra invecchiamento fisiologico e malattia; tuttavia, analizzando il problema dal punto di vista genetico ed epigenetico, si osservano alcuni meccanismi che sono soppressi nella patologia, mentre rimangono attivi con azione protettiva nell'invecchiamento fisiologico. (Lupo et al., 2019). Il cervello del paziente anziano mostra comunemente una sommatoria di mutazioni genetiche non riparate, nel fenomeno cosiddetto del *genosenium* (Lodato et al., 2018), queste hanno ricadute profonde sugli esiti ed i prodotti di vari meccanismi epigenetici, tra cui i processi di *splicing* alternativo dei segmenti genomici e la regolazione mediata da sequenze di RNA non codificante (ncRNA). I dati più interessanti sono stati ottenuti con tecniche che hanno consentito un approccio di analisi del tessuto specifico, sulla base del tipo cellulare, evidenziando le differenze che sussistono tra le varie tipologie presenti nel SNC.

Alcuni geni hanno mostrato forti evidenze di associazione con i *deficit* cognitivi tipici dell'anziano, in studi che hanno riguardato in parte soggetti affetti da malattia di Alzheimer ed in parte volontari sani. Si tratta di studi comparativi svolti su banche genomiche, con conseguente elevata capacità di evidenziare *trend* ed associazioni. Tra i geni più interessanti è possibile citare la plexina B1 (PLXNB1), un gene che codifica per un recettore per le semaforine e la INPPL1 (*INositol Polyphosphate Phosphatase Like 1*), che si inserisce nella via di biosegnalazione mediata dall'insulina e dai fattori di crescita insulino-simili (Yu et al., 2018). Le semaforine sono una famiglia di molecole segnale coinvolte nella differenziazione neuronale a livello embrionale, perché responsabili della formazione di collegamenti interneuronali. Un altro studio (Tasaki et al., 2018; Nakayama et al., 2015) ha evidenziato un ruolo importante per la semaforina 3F (SEMA3F), anch'essa coinvolta nella via del recettore insulinico, in particolare nella regolazione delle chinasi PI3K e AKT/PKB. Un'ulteriore famiglia di interesse è quella delle *Heat Shock Proteins* (HSPs), cioè i mediatori proteici deputati a reagire a varie tipologie di shock, tra cui quelli termici. Le evidenze più forti riguardano HSPB2 e, soprattutto, HSPA2 (Mostafavi et al., 2018). Queste osservazioni sottolineano l'esistenza di *pathway* molecolari la cui deregolazione è associata in modo molto forte all'insorgenza di *deficit* cognitivi. Tra questi, la via di AKT sembra essere particolarmente critica, perché controlla a monte l'espressione del fattore di trascrizione REST, il cui accumulo neuronale ha un ruolo protettivo. In particolare, AKT regola l'attività della chinasi GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase-3 β*), la quale controlla la via dipendente dalla β -catenina e quindi il livello di espressione di REST, il cui accumulo risulta compromesso nei soggetti con problematiche cognitive (Lu et al., 2014).

Il declino cognitivo tipico della tarda età è legato sia ad eventi di morte neuronale, allorché minoritari e limitati alla perdita della popolazione neuronale con somi di grandi dimensioni, sia alla deregolazione di particolari programmi genetici cellulari. I geni per i quali si osserva una tipica deregolazione sono spesso coinvolti in processi di regolazione della funzionalità neuronale e sinaptica, della comunicazione cellulare, del trasporto ionico e della morte cellulare programmata (Soreq, 2017). I meccanismi che conducono a queste modifiche sono principalmente di tipo epigenetico. La deregolazione dell'espressione genica è tipica di diverse aree dell'encefalo, nell'invecchiamento fisiologico si osserva in modo spiccato presso le aree corticali, mentre la compromissione dell'ippocampo spesso si associa a condizioni patologiche (Berchtold et al., 2013). A livello epigenetico, si osservano alterazioni indotte dall'invecchiamento a carico dei processi di acetilazione degli istoni e metilazione del DNA. Ad esempio, si osserva una riduzione nei livelli di H3K27ac presso i promotori di vari geni (Cheng et al., 2018). Il processo di metilazione del DNA avviene a carico di siti detti CpGs ove si trovano adiacenti citosina e guanina, moltissimi mostrano un livello di metilazione dipendente dall'età e questo conduce ad una diversa espressione genica e all'attivazione di vie alternative di *splicing* (Gasparoni et al., 2018; Raj et al., 2018).

I geni connessi alla funzionalità del sistema immunitario e alla regolazione dei processi infiammatori sono sovra-regolati nei processi di invecchiamento, il fattore di regolazione più importante è la presenza

dell'istone acetilato H3K27ac. Nei geni sotto-regolati nei processi di invecchiamento H3K27ac si trova solo presso le regioni promotoriali, mentre nei geni sovra-regolati troviamo H3K27ac sia presso i promotori, sia presso i corpi genici. La perdita di H3K27ac nei corpi genici comporta l'aumento nell'espressione di questi (Mostafavi et al., 2018; Cheng et al., 2018). Lo spostamento verso un fenotipo pro-infiammatorio si osserva in modo notevole presso le cellule gliali del SNC. In modelli di *brain aging* la microglia tende a sovra-esprimere geni collegati alla risposta immunitaria, alla struttura del citoscheletro ed ai processi di adesione (Galatro et al., 2017); nella corteccia osserviamo una maggiore espressione anche di geni connessi alla regolazione della funzionalità degli endosomi e alla sintesi di fibre contenenti proteina amiloide (Olah et al., 2018). Nonostante queste differenze, si ritiene che le cellule microgliali di diverse aree dell'encefalo seguano un unico *pattern* di espressione. Contrariamente, gli astrociti mostrano un comportamento specifico e diverso da zona a zona, anche se i processi di *brain aging* tendono ad uniformare i *pattern*, silenziando le differenze tra le varie aree (Soreq, 2017). Negli astrociti di un cervello invecchiato le funzioni omeostatiche diminuiscono, ne consegue la degenerazione delle strutture sinaptiche e la possibile tossicità neuronale, mediate, per esempio, dall'attivazione dei fattori del complemento (Boisvert et al., 2018).

1.6 MICROBIOTA ED INFIAMMAZIONE

Il microbiota è costituito dalla ricca popolazione di microorganismi che popola il tratto gastro-intestinale di ogni individuo, in un numero variabile tra 10^{13} e 10^{14} unità. Si tratta di una popolazione principalmente batterica, anche se si sta delineando sempre di più il contributo significativo da parte di funghi e virus. Il microbiota vive in profonda simbiosi con l'individuo ospite, svolgendo una serie di funzioni utili, tra cui la produzione di metaboliti secondari ed il mantenimento della barriera intestinale. Questa barriera è costituita da uno strato di cellule epiteliali del lume intestinale, strettamente adese le une alle altre, grazie alla presenza di *tight junctions*, rivestite da uno strato di muco, che regola l'assorbimento di nutrienti. Presso la barriera intestinale si trovano le cellule M delle placche di Peyer, dove avviene la sorveglianza immunologica dei microorganismi presenti nel lume. Gli antigeni rilevati in queste sedi vengono trasportati nei linfonodi e consentono la maturazione del sistema immunitario. Un microbiota normale, con una scarsa componente antigenica di tipo pro-infiammatorio stimola la tolleranza immunologica, ne consegue una maturazione armonica del sistema immunitario innato ed adattativo, quindi un generale stato di benessere dell'individuo. Le alterazioni nella composizione del microbiota, note come disbiosi sono profondamente legate ad età, dieta e stile di vita. La disbiosi può rompere l'equilibrio omeostatico tra flora intestinale e sistema immunitario, esacerbando i fenomeni infiammatori locali.

Il tutto può scatenare un'inflammatione sistemica cronica e di basso grado, con conseguenze negative a carico di diversi apparati, ad esempio con sviluppo di malattie infiammatorie intestinali, aterosclerosi, diabete di tipo 2 e altre affezioni metaboliche. Il SNC è sempre stato considerato un distretto immuno-privilegiato, equipaggiato con un *pool* separato di cellule immunitarie microgliali altamente specializzate

ed isolato dall'attività immunitaria sistemica, grazie alla presenza della barriera emato-encefalica. Di recente si è osservato che l'infiammazione sistemica conseguente alla disbiosi intestinale interagisce con la BEE e ne favorisce l'alterazione, questo comporta un possibile trasferimento di molecole e cellule infiammatorie verso il SNC e la conseguente insorgenza di neuroinfiammazione (Mou et al., 2022). Questo meccanismo potrebbe essere una delle cause scatenanti dei processi di *brain aging* non fisiologico. L'esposizione del parenchima del cervello a molecole e cellule infiammatorie di provenienza intestinale è ostacolata dalla presenza della barriera emato-encefalica, già citata come elemento di comunicazione tra il distretto ematico ed i fluidi intracellulari del SNC. L'unità funzionale di base della BEE è costituita dalla *NeuroVascular Unit* (NVU) costituita da una serie di elementi cellulari e tissutali che collaborano in stretta sinergia per garantire la corretta permeabilità e preservare la salute encefalica. Lo strato più esterno è costituito dalle cellule endoteliali dei capillari vasali, che hanno caratteristiche tipiche: assenza di fenestrature, presenza di giunzioni intercellulari ad elevata tenuta, quali le *tight junctions* e le *adherent junctions*, esposizione di numerosissimi trasportatori di infusso ed efflusso, molti dei quali sfruttano meccanismi di trasporto attivo (Thomsen et al., 2017). Al di là dello strato endoteliale troviamo i periciti, cellule murali di eterogenea natura che si collocano nella struttura basale del vaso, dove ne garantiscono l'integrità tissutale ed il mantenimento della normale permeabilità. I periciti controllano l'omeostasi del sistema immunitario ed intervengono nei processi di trasporto leucocitario verso i tessuti circostanti (Sweeney et al., 2016; Török et al., 2021). La terza componente cellulare della BEE è costituita dagli astrociti, che formano dei processi, noti come peduncoli astrocitari, i quali rivestono i capillari encefalici dall'esterno, creando la barriera limitante gliale. Questa struttura, formata anche dalla membrana basale dell'epitelio, riveste i capillari encefalici senza soluzione di continuità ed agisce da barriera immunologica del SNC. Gli astrociti hanno funzioni di supporto sull'omeostasi dell'endotelio vasale e possono reagire a stimoli immunitari (Horng et al., 2017). La membrana basale della BEE è prodotta dalla sinergia dei vari tipi cellulari appena descritti, essa è formata da laminina, collagene di tipo IV, proteoglicani e glicoproteine. La membrana basale rientra nella struttura della membrana limitante gliale e contribuisce ad ostacolare l'ingresso di leucociti presso il SNC (Thomsen et al., 2017; Gautam et al., 2020). Tra lo strato di membrana basale prodotto dalle cellule endoteliali vasali e quello prodotto dagli astrociti è presente uno spazio perivascolare, in cui vengono drenati liquidi, rifiuti e scarti proteici di provenienza encefalica. Questo spazio fa parte del sistema glinfatico del cervello, recentemente evidenziato come disgiunto dal classico sistema linfatico, ma le cui funzioni sono simili. Il sistema glinfatico funziona grazie al contributo delle cellule gliali, in particolare astrociti, che drenano gli eccessi di liquidi e, con essi, i rifiuti idrosolubili del metabolismo, in seguito ceduti alla circolazione venosa sistemica. La linfa contenuta nello spazio perivascolare può contenere macrofagi, la cui attivazione favorisce l'infiltrazione di cellule immunitarie nel SNC (Wraith et al., 2012; Ransohoff and Engelhardt, 2012; Wardlaw et al., 2020).

L'infiammazione cronica di basso grado destabilizza la struttura della BEE agendo a diversi livelli e

questo comporta un aumento della permeabilità, con possibile ingresso di fattori infiammatori ad azione neurotossica. Le cellule componenti la NVU si comportano da sensori dello stato infiammatorio, questo riguarda tutte le sue componenti, ma in modo più significativo le cellule endoteliali. Alcuni attori molecolari connessi ai fenomeni infiammatori mediati dal microbiota possono danneggiare transitoriamente il gliococalice dell'endotelio vasale, aumentando la permeabilità di barriera. Questo è noto per il TNF- α ed il LPS (lipopolisaccaride), che aumentano i livelli ematici del sindecano-1, un biomarcatore di danno (Wiesinger et al., 2013). Un secondo meccanismo di danno riguarda la modifica del programma di trascrizione genica delle cellule endoteliali, il quale di norma prevede un'espressione limitata di proteine coinvolte nei processi infiammatori, ad esempio i recettori PRR e TLR, i recettori per le chemochine e le molecole responsabili dell'adesione cellulare (Obermeier et al., 2013). Uno studio del 2010 ha evidenziato, per esempio, un'aumentata espressione genica di: TLR2, TLR3, recettore CXCR2 per le chemochine, TNF- α e IL-1 β (Nagyoszi et al., 2010; Haarmann et al., 2019). Tra le molecole di adesione, uno studio del 2019 sui topi in avanzata età, ha evidenziato un aumento nella VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), connesso a fenomeni di infiammazione centrale (Yousef et al., 2019). Un terzo meccanismo di riposta della BEE all'infiammazione basale corrisponde all'assemblaggio degli inflammasomi, attivato dalle citochine pro-infiammatorie circolanti, che favoriscono la produzione di proteine della famiglia di NLR, in particolare NLRP3. L'inflammasoma, in questo distretto, indebolisce le *tight junctions* e favorisce un'aumentata permeabilità di barriera (Nyùl-Tòht et al., 2017). La degenerazione delle giunzioni è imputabile anche ad alcune citochine, principalmente all'IL-6, ma con contributo anche delle IL-17 e 22 (Kebir et al., 2007). Alcune modificazioni nella struttura della BEE compaiono spontaneamente durante i processi di invecchiamento: le pareti dei capillari cerebrali si assottigliano, così come la lamina basale, il numero e la dimensione degli astrociti aumenta, con ingrossamento dei rispettivi peduncoli, i periciti perdono in parte il loro ruolo strutturale, le giunzioni strette degenerano in numero e in qualità, con perdita di funzione dei trasportatori di efflusso, come la p-glicoproteina. Queste osservazioni dimostrano che l'aumento di permeabilità della BEE è un fenomeno che contraddistingue di per sé l'invecchiamento del SNC ed è lecito attendersi che i fenomeni infiammatori, esacerbando il processo, possano favorire il *brain aging* (Bors et al., 2018; Erdö et al., 2017).

A livello cellulare, l'evento responsabile del danneggiamento della BEE è l'ingresso di linfociti T attivati della famiglia Th17, che secernono le metalloproteinasi di matrice 3 e 9 (Kebir et al., 2007). Suddetti enzimi degenerano la membrana basale favorendo l'accesso al SNC da parte di leucociti e monociti, con possibili fenomeni infiammatori a carico del parenchima d'organo. L'attivazione esogena della neuroinfiammazione è causata anche dalla chemotassi dei leucociti circolanti nel SNC, che segue alcuni specifici *pattern* di citochine e chemochine. Essi sono oggetto di ricerca perché acquisiscono il valore di marcatori di neuroinfiammazione e possono essere correlati a fenomeni di invecchiamento non fisiologico del cervello. Ad esempio, uno studio ha evidenziato come critico l'aumento dei livelli di CXCL8, CXCL9 e IL-6 (Torres

et al., 2018), mentre un altro lavoro ha sottolineato l'importanza di CXCL13, CCL3, CCL7, CCL8 e CXCL9 (Lepennetier et al., 2019). Anche la microglia collabora alla produzione della neuroinfiammazione, acquisendo lo status di *primed microglia*. Si tratta di uno stato in cui le cellule aumentano l'espressione basale di marcatori e mediatori di infiammazione, acquisendo un fenotipo pro-infiammatorio più spinto, con bassa soglia di attivazione e reattività eccessiva agli stimoli (Cornejo et al., 2016). La motilità delle cellule riduce a causa della minore risposta nella via del recettore CX3CR1, cambia la tipologia di citochine prodotte basalmente, con aumento dei fattori pro-infiammatori (IL-1, IL-6, TNF- α , interferone- γ [IFN- γ]) e riduzione di quelli anti-infiammatori (IL-10, TGF- β [*Transforming Growth Factor- β*]) e viene modificata la regolazione dei geni associati alla funzione di *sensing* (Minogue et al., 2014; Cornejo et al., 2016). La funzione di *sensing* corrisponde alla capacità delle cellule microgliali di pattugliare il tessuto nervoso alla ricerca di patogeni. Gli astrociti, dietro stimolazione delle citochine pro-infiammatorie secrete dalle cellule microgliali, acquisiscono un fenotipo reattivo noto come A1, in cui perdono le funzioni omeostatiche di regolazione della sopravvivenza neuronale, crescita, sinaptogenesi e fagocitosi, potendo facilmente indurre la morte delle cellule vicine (Clarke et al., 2018). In Figura 10 è possibile osservare una rappresentazione schematica degli *step* fondamentali. attraverso cui l'infiammazione latente di basso grado si genera nel distretto intestinale e si propaga fino a coinvolgere l'encefalo.

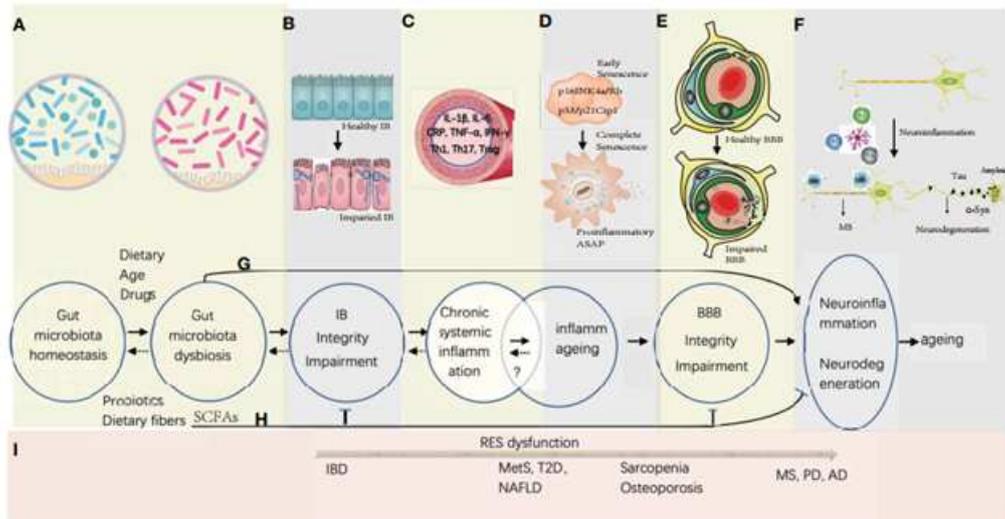


Figura 10: Meccanismo di generazione dell'infiammazione cronica di basso grado a livello intestinale e suo trasferimento lungo l'asse cervello-intestino, in relazione all'insorgenza di patologie neurodegenerative e all'accelerazione dei processi di *brain aging* (Mou et al., 2022).

Dopo aver evidenziato i meccanismi con cui il privilegio immunitario del SNC decade in seguito allo sviluppo di infiammazione sistemica comportando la diffusione di questa al SNC, considerando l'associazione tra disbiosi ed infiammazione sistemica, si riportano alcuni esempi ed alcune evidenze che correlano

direttamente disbiosi intestinale e *brain aging*. Gli studi sono spesso svolti su individui centenari, come esempi di invecchiamento armonico e fisiologico ed hanno rilevato un microbiota sano, con capacità di produrre ben standardizzati derivati metabolici, tra cui alcuni acidi biliari secondari. Si è indagato il ruolo dell'acido alloisolitocolico (isoalloLCA, diastereomero del più noto acido litocolico, un comune acido biliare), che sembra avere un'azione antibatterica, permettendo il controllo sulla proliferazione dei batteri patobionti, cioè quegli elementi del microbiota che, in caso di anomala proliferazione, possono produrre conseguenze negative sull'ospite (Sato et al., 2021). Alcuni acidi biliari secondari stimolano la proliferazione e l'attività di cellule immunitarie anti-infiammatorie, comportano un miglioramento dell'infiammazione basale, con conseguenze positive sui fenomeni di invecchiamento di vari distretti, primariamente il cervello. È stata evidenziata un'associazione interessante tra la colonizzazione intestinale di *Paenalcabigenes hominis* e lo sviluppo di *deficit* cognitivi, in particolare a livello delle terminazioni del nervo vago, forse attraverso l'azione pro-infiammatoria del lipopolisaccaride di parete di questo microorganismo, che può comportare danno alla BEE e possibile attivazione di processi di neurodegenerazione (Lee et al., 2020).

1.7 ANOMALIE MITOCONDRIALI

La funzionalità mitocondriale è fortemente legata alla produzione di specie reattive dell'ossigeno e al danno che ne consegue, per due principali motivi: da un lato la catena di trasporto degli elettroni è la principale via di produzione cellulare di ROS, dall'altro i mitocondri sono il primo e principale target del danno da ROS, che ne può compromettere la funzionalità. Molti studi svolti su modello umano e animale hanno evidenziato, nell'invecchiamento, un aumento della produzione di ROS, accompagnato da un calo nelle difese anti-ossidanti del neurone e questo comporta la comparsa di alterazioni a carico del metabolismo respiratorio mitocondriale, con possibile instaurarsi di un circolo vizioso che coinvolge anche altri processi fisiologici controllati dai mitocondri, come la morte cellulare per apoptosi. Tra le evidenze più significative è possibile citare gli studi *post-mortem* su soggetti umani, che hanno evidenziato un aumentato livello di proteine ossidate o nitate, abbinato ad una ridotta espressione di superossido dismutasi e glutazione perossidasi e ad una disfunzione del complesso I della catena respiratoria, nei neuroni di ippocampo e corteccia frontale (Venkateshappa et al., 2012), dati in seguito confermati anche con studi *in vivo* (Mandal et al., 2012). Spostando l'attenzione sugli studi su modello animale, nei ratti si osserva una riduzione età-dipendente nell'attività della superossido dismutasi e dei complessi respiratori I e IV, probabilmente a causa del danno mediato dai ROS (Navarro and Boveris, 2004), mentre sui topi è emersa una riduzione del rapporto glutazione ridotto/glutazione ossidato (Rebin et al., 2007).

Esistono profonde motivazioni evolutive per cui i neuroni sfruttano la via catabolica del glucosio come principale via di produzione di ATP: da un lato le altre vie hanno una capacità di produzione energetica troppo lenta per sostenere le necessità cellulari, dall'altro si tratta della via meno problematica dal punto

di vista della produzione di ROS (Schonfeld and Reiser, 2013; Kowald and Kirkwood, 2000; Terman et al., 2010). Un aspetto da considerare è la polarizzazione della cellula neuronale, la cui particolare morfologia consente di definire distretti differenti, con funzione ben standardizzate: soma cellulare, albero dendritico, assone e terminale sinaptico. Si osservano considerevoli differenze tra i mitocondri del terminale sinaptico e quelli siti in ogni altro distretto cellulare, detti non-sinaptici (Obashi and Okabe, 2013; Lin and Sheng, 2015). Nei neuroni sinaptici la produzione mitocondriale di ROS, in particolare perossido di idrogeno, è maggiore (Borras et al., 2003, 2010), questo conduce alla compromissione dei processi di respirazione cellulare e ad una maggiore suscettibilità alla deregolazione dello ione calcio nell'invecchiamento, mentre nei neuroni non-sinaptici non si osservano cambiamenti così spiccati. L'accumulo presso i mitocondri sinaptici di danno ossidativo comporta la progressiva disfunzione di questo compartimento, che può esitare nella degenerazione delle terminazioni sinaptiche.

Per comprendere in profondità le alterazioni mitocondriali è necessario concentrarsi sulla dinamica mitocondriale cellulare, costituita da una serie di processi che regolano il numero di mitocondri, controllano la loro attività e garantiscono la sostituzione degli organelli mal-funzionanti. Si tratta dei processi di fissione e fusione tra mitocondri, autofagia e biogenesi, di cui i primi due sono finalizzati a rimescolare il DNA mitocondriale, "diluendo" eventuali mutazioni, mentre gli ultimi due garantiscono la sostituzione degli organuli non più efficacemente attivi (Grimm and Eckert, 2017). La fissione di un mitocondrio a formare due nuovi organelli è controllata dalle GTPasi dinamina-dipendenti, una famiglia di proteine altamente conservate evolutivamente, tra cui la DRP1 (*Dynammin-Related Protein 1*) e la FIS1 (*FISsion protein 1*) (Pernas and Scorrano, 2016). La DRP1 è controllata a monte per fosforilazione ad opera di varie chinasi, principalmente la protein chinasi 1 α dipendente dal complesso calcio/calmodulina (CAMK1 α), ma anche la protein chinasi A (PKA, *Protein Kinase A*) ed il complesso calcio-calcineurina (Campello and Scorrano, 2010). Normalmente DRP1 è dispersa nel citosol, la sua defosforilazione consente l'interazione con la membrana mitocondriale, dove viene reclutata da FIS1. La fusione mitocondriale è il principale meccanismo di tutela del genoma mitocondriale, particolarmente esposto al danno ossidativo e privo di sistemi di riparazione intrinseci. Anche in questo processo intervengono delle GTPasi dinamina-dipendenti, in particolare le mitofusine (MFN1 e MFN2) che regolano la fusione della membrana esterna dei mitocondri e la proteina OPA1 (*Optic Atrophy 1*) che regola la fusione delle membrane interne (Campello and Scorrano, 2010; Friedman and Nunnari, 2014). L'autofagia dei mitocondri mal-funzionanti prende il nome di mitofagia e viene attivata dalla diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale, che favorisce l'accumulo superficiale di PINK1 (*PTEN-INDuced putative Kinase 1*). Tale chinasi recluta la parkina, anche nota come E3 ubiquitina ligasi, che guida la formazione dell'autofagosoma attorno all'organello mal-funzionante (Twig et al., 2008; Youle and Narendra, 2011). La biogenesi di mitocondri è la principale via che garantisce una maggiore produzione di energia, essa viene regolata dalla PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 α*) e dalla via del suo sostrato, il fattore di trascrizione

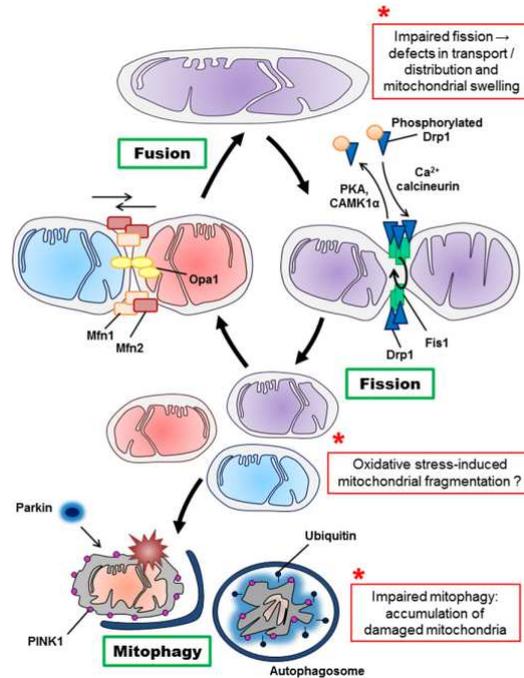


Figura 11: Rappresentazione schematica dei meccanismi di mitofagia, fissione e fusione di mitocondri, con indicazione delle principali anomalie che si verificano nel *brain aging* (Grimm and Eckert, 2017).

zione mitocondriale TFAM (*Mitochondrial Transcription Factor A*) (Joseph et al., 2013). I processi di dinamica mitocondriale illustrati in questo paragrafo sono schematizzati in Figura 11.

Modelli umani ed animali di *brain aging* hanno mostrato diverse alterazioni a carico dei processi appena descritti, con conseguente disfunzione mitocondriale. Le anomalie del processo di fissione, principalmente imputabili ad alterazioni della DRP1 e della FIS1, comportano disomogenea distribuzione del DNA mitocondriale, diminuita produzione di ATP, aumentato rilascio di ROS e possibile induzione di apoptosi (Knott et al., 2008; Oettinghaus et al., 2016). Aberrazioni della DRP1 sono state osservate nelle cellule del Purkinje, associate ad una morfologia anomala rigonfiata e a compromissioni della catena respiratoria, legate in particolare ai complessi I e IV, che esitano nella degenerazione del cervelletto (Kageyama et al., 2012). In modello animale, in particolare nei topi, si è osservata un aumento nei livelli di espressione cerebrale di DRP1 tra i 5 ed i 12 mesi, mentre in età avanzata (12-24 mesi) il *trend* si inverte ed i livelli di DRP1 calano (Stauch et al., 2014). Un pattern inverso si ritrova per le proteine MFN1, MFN2 e OPA1 che conferisce un fenotipo fusogenico (Stauch et al., 2014). Si pensa che l'aumento nei processi di fusione riscontrato sia un fattore protettivo che garantisce invecchiamento sano e longevità, mentre, di fronte a mutazioni nelle suddette proteine, si osservano evidenti compromissioni della rete mitocondriale, che esitano in uno stato di scarsa salute del tessuto nervoso. In ultima, le alterazione della biogenesi possono comportare l'accumulo di danni a carico del DNA mitocondriale degli organelli

pre-esistenti, i quali non possono essere oggetto di regolare *turnover*. Il calo nella biogenesi in tarda età non è legato alla riduzione nell'espressione di TFAM, la cui concentrazione aumenta fino al 70%, bensì nella perdita della capacità di legame di TFAM verso il DNA mitocondriale (Picca et al., 2013).

Vi sono evidenze di una differenza piuttosto nitida nella funzionalità mitocondriale cerebrale tra i due sessi, sia in termini di processi di metabolismo energetico, sia nella regolazione dello stress ossidativo. Nelle cellule invecchiate del cervello dell'uomo si osserva una sotto-regolazione di processi quali: catena di trasporto degli elettroni, fosforilazione ossidativa, metabolismo dei ribonucleotidi, metabolismo dell'ATP, trasporto mitocondriale. I livelli di glutazione sono più elevati nei neuroni della donna e questa sembra essere meglio protetta contro lo stress ossidativo, almeno fino alla menopausa (Berchtold et al., 2008; Vina and Borras, 2010). In un modello animale di femmina di ratto sottoposta a ovariectomia, il livello di produzione di ROS diviene equiparabile a quello del maschio, mentre cala dopo somministrazione di estradiolo, atto a simulare una normale attività delle gonadi femminili (Borras et al., 2003). L'estradiolo sembra vantare una serie di proprietà neuroprotettive: favorisce il trasporto di glucosio, accelera la via glicolitica ed il ciclo di Krebs, migliorando il catabolismo energetico neuronale, attiva la catena di trasporto degli elettroni, promuove le difese antiossidanti, tra cui l'attività della superossido dismutasi e dei sistemi che coinvolgono il glutazione, riduce il danno da ROS, modulando varie vie di biosignalazione, tra cui quella del fattore NF- κ B. Questi effetti sono dovuti all'azione sui recettori estrogeni ER α e ER β (Klinge et al., 2004). L'azione neuroprotettiva dell'estradiolo si può correlare alla produzione fisiologica *in loco* di neurosteroidi, androgeni ed estrogeni secreti a livello encefalico con azioni migliorative sul metabolismo cellulare, la cui alterazione è descritta in alcuni modelli di invecchiamento (Caruso et al., 2013).

1.8 SENESCENZA CELLULARE

Come già detto, il profilo di trascrizione delle cellule della corteccia di un cervello invecchiato mostra delle anomalie nella regolazione di alcuni geni, implicati nel mantenimento della plasticità sinaptica, nella risposta cellulare ai meccanismi di stress e nella riparazione dei danni genomici. Tra le proteine codificate dai geni deregolati possiamo ricordare la subunità GluR1 del recettore AMPA per il glutammato, la subunità R2A del recettore glutammatergico NMDA, alcune proteine che mediano i processi di rilascio e riciclo delle vescicole sinaptiche, il trasporto di macromolecole ed il *turnover* proteico (Lu et al., 2004). Le alterazioni nella trascrizione di questi geni si osservano al di sopra dei 40 anni e conducono ad anomalie nei processi di plasticità sinaptica, visibili come alterazioni morfologiche dei neuroni eccitatori glutammatergici. Le spine dendritiche rappresentano i siti post-sinaptici presenti su ciascun dendrite. Nell'anatomia del cervello umano, esse si dividono in quattro classi: fini, fillopodii (lunghe), tozze ed a fungo. Le spine possono essere classificate anche per la struttura della loro superficie post-sinaptica esprimente i recettori per i neurotrasmettitori, che può essere "perforata" cioè ricca di discontinuità o

uniforme. Nelle spine fini la superficie è spesso uniforme, queste strutture sono tendenzialmente instabili e degenerano nell'invecchiamento, mentre le spine a fungo hanno una superficie perforata e sono molto più stabili (Petralia et al., 2014; Bloss et al., 2011). Le alterazioni più importanti ai fini della comprensione dei processi di *brain aging* riguardano la struttura ippocampale e la corteccia. Il mantenimento dell'architettura del tessuto è fondamentale per garantire normali meccanismi di cognizione e memorizzazione, per esempio l'interazione tra le aree CA1 e CA3 dell'ippocampo avviene, fisiologicamente, con una dinamica oscillatoria ed è essenziale per l'apprendimento. Nell'area CA1 dell'ippocampo si osserva una diminuita dimensione delle superfici post-sinaptiche, cui consegue una riduzione nell'ampiezza dei potenziali post-sinaptici eccitatori (Nicholson et al., 2004). I potenziali post sinaptici sono di norma mantenuti, anche di fronte ad alterazioni nella struttura delle sinapsi, da processi di adattamento noti come potenziamento a lungo termine (LTP, *Long Term Potentiation*) e depressione a lungo termine (LTD, *Long Term Depression*). Nel caso dell'area CA1 ippocampale, la riduzione dei potenziali eccitatori non è compensata da fenomeni di LTD, perché la soglia di attivazione di questi si alza, a causa dell'aumento basale delle concentrazioni intracellulari di calcio (Landfield et al., 1978). La deregolazione del calcio è conseguenza di una maggiore espressione di canali di tipo L nei neuroni invecchiati, che si osserva soltanto nell'area CA1 (Thibault and Landfield, 1996). Nell'area CA3, contrariamente, si osserva una riduzione nella densità di spine, senza alterazioni nella struttura della superficie post-sinaptica della singola spina e senza anomalie nella regolazione del calcio (Maglione et al., 2019). Per quanto concerne la corteccia, su modello animale di invecchiamento si è osservato un aumento nella frequenza di scarico di potenziali d'azione, si ritiene che l'aumento o la riduzione dello scarico di potenziali d'azione nei neuroni corticali possano peggiorare le funzioni cognitive (Chang et al., 2005). Le alterazioni che riguardano la struttura dei neuroni ippocampali e corticali sono riassunte in Figura 12.

La senescenza è un fenomeno descritto per varie tipologie di cellule e si pensa segua differenti meccanismi. Nel caso più noto, quello della senescenza replicativa, l'erosione dei telomeri conduce alla perdita delle capacità di replicazione. Sono oggi note altre tipologie di senescenza, con meccanismo molecolare differente e che possono riguardare anche cellule terminalmente differenziate, come i neuroni. Tra queste è possibile citare: la senescenza prematura indotta da stress, la senescenza programmata nel corso dell'embriogenesi e la senescenza indotta dalla terapia nelle cellule cancerose (Harley et al., 1992; Bielak-Zmijewska et al., 2018; Jurk et al., 2012; Piechota et al., 2016). La senescenza cellulare comporta la comparsa di una serie di segni tipici, definibili come *hallmarks of senescence*, alcuni dei quali potrebbero contribuire ai fenomeni di invecchiamento di diversi distretti, tra cui il cervello. I segni tipici dei processi di senescenza cellulare sono: alterazioni della funzionalità mitocondriale, compromissione dell'attività dei lisosomi, alterazioni a carico della cromatina, blocco nell'autofagia e nei meccanismi di degradazione proteica, cambiamenti metabolici, resistenza all'apoptosi e aumento nella secrezione di fattori vari. Quest'ultimo aspetto è così significativo da definire un *Senescence Associated Secretory Phenotype* (SASP),

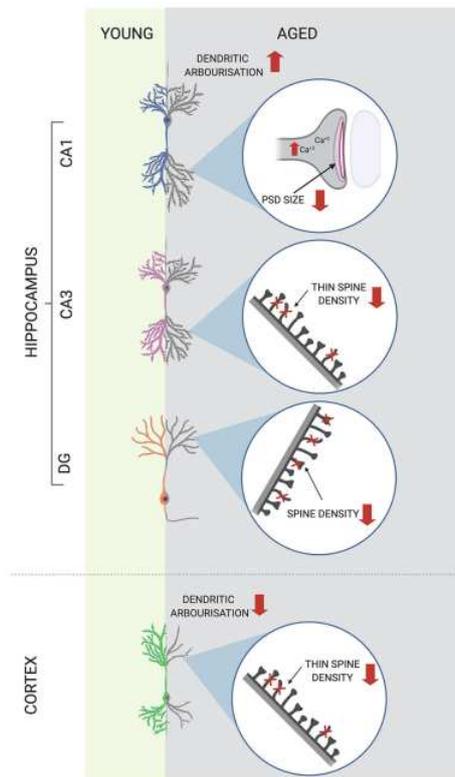


Figura 12: Macro e micro alterazioni della struttura dei neuroni ippocampali e corticali osservate nei fenomeni di *brain aging* (Sikora et al., 2021).

che comprende varie citochine, fattori di crescita, metalloproteinasi e altri mediatori. Alcune anomalie tipiche dei fenomeni di senescenza riguardano la risposta al danno genomico, con accumulo nella cromatina di unità di istone γ -H2AX, fosforilato presso la serina in posizione 139 e nel citoplasma di *p53-binding protein 1*, che attivano cascate di biosegnalazione mediate da chinasi, tra cui quelle regolatrici del ciclo cellulare. Nelle cellule in divisione, si osserva l'attivazione delle chinasi dipendenti da ciclina, regolatori ultimi del ciclo cellulare, tra cui è necessario citare le proteine $p21^{CIP1/WAF1}$ e $p16^{INK4a}$. Si osserva, inoltre, un aumento nell'attività di un particolare enzima litico lisosomiale, la *Senescence-Associated- β -galactosidase* (SA- β -gal), con incremento nella dimensione e nella granularità delle cellule (Gorgoulis et al., 2019; Bielak-Zmijewska et al., 2018; Herranz and Gil, 2018; Dimri et al., 1995).

La senescenza è un fenomeno che riguarda diversi tipi cellulari che compongono il SNC, tra questi i processi a carico di astrociti, microglia e neuroni hanno profonde ricadute sui fenomeni di invecchiamento. Negli astrociti, la senescenza può essere indotta da stress o svilupparsi in forma replicativa classica per l'erosione dei telomeri (Cohen and Torres, 2019). Gli astrociti senescenti sviluppano alterazioni nella morfologia cellulare, dovute principalmente alla sovra-espressione di GFAP (*Glial Fibrillar Acid Protein*), la maggior componente proteica dei filamenti intermedi del citoscheletro e di un secondo componente di

questi, la vimentina (Verkhatsky et al., 2010; Salminen et al., 2011). Inoltre, sono compromesse le funzionalità omeostatiche, tra cui la regolazione del segnale eccitatorio glutammatergico, con maggiore rischio di eccitotossicità, oppure il ridotto controllo dei livelli di potassio a causa della sotto-espressione dei trasportatori di questo ione (Limbad et al., 2020). Le cellule microgliali sviluppano, a loro volta, aberrazioni strutturali: aumento in numero e densità, disorganizzazione nella loro distribuzione tissutale, regressione dei processi cellulari (Spittau, 2017). Queste aberrazioni comportano una maggiore tendenza all'attivazione, associata ad una riduzione nel movimento dei processi cellulari e nella migrazione verso i distretti di danno tissutale, che sfocia nell'infiammazione aspecifica ed immotivata del tessuto, i cui esiti convergono con quanto visto in precedenza (Wong, 2013; Damani et al., 2011). All'induzione di fenomeni neuroinfiammatori corrobora in modo importante il SASP, che comporta una sovra-produzione di citochine e fattori pro-infiammatori. Un fenomeno particolare, evidenziato solo in tempi più recenti, è la possibilità che anche i neuroni producano fenomeni di senescenza. È stato evidenziato come marcatore fondamentale in questi processi, l'aumento nei livelli di SA- β -gal (Geng et al., 2010). Altri segni di senescenza neuronale sono stati messi in luce a carico dei neuroni del Purkinje del cervelletto: danno a carico del DNA e conseguente attivazione della chinasi $p21^{CIP1/WAF1}$, attivazione della via delle MAPK, danno ossidativo e produzione di ROS, rilascio di IL-6 e aumento nella percentuale di eterocromatina (Jurk et al., 2012). Il fenotipo SASP è profondamente espresso nella senescenza neuronale, con rilascio di chemochine (CXCL1), inibitore del fattore attivante il plasminogeno (PAI-1) e substrati di fattori di crescita insulino-simili (Ishikawa and Ishikawa, 2020). A livello di regolazione dell'espressione genica, un segno molto chiaro di senescenza neuronale è la sovra-regolazione del modulatore REST, che blocca i geni inducenti l'apoptosi e favorisce la sopravvivenza cellulare (Lu et al., 2014). A livello epigenetico, si osserva un differente *pattern* di espressione genica, legato a: perdita di istoni, loro alterata modificazione, cambiamenti nella metilazione del DNA.

I processi di senescenza cellulare impattano sul *brain aging* principalmente su tre piani: alterazioni epigenetiche, modifica dei processi degradativi e sostentamento dei processi neuroinfiammatori. Alterazioni nella regolazione dell'espressione genica impattano soprattutto sulla morfologia e sulla plasticità delle sinapsi. Le conseguenze negative sono visibili a carico di funzioni come la cognizione e l'apprendimento. Le anomalie si esplicano su tre livelli: metilazione del DNA, rimodellamento della cromatina e pattern di ncRNA regolatorio (Harman and Martin, 2020). Come processo esemplificativo è possibile citare l'alterata espressione e funzione degli enzimi rimodellanti la cromatina, come le istone acetil-transferasi (HATs) e le istone deacetilasi (HDACs) (Barter and Foster, 2018). Le strutture di eterocromatina tendono a distaccarsi dalla membrana nucleare, poiché degenerano i ponti tra questi due elementi, formati da lamina B1, istone H3 trimetilato a livello della lisina in posizione 27 (H3K27m3) e a livello di quella in posizione 9 (H3K9me3) (Yang and Sen, 2018). Infine, la ridotta produzione dell'istone deacetilasi sirtuina 1 (SIRT1) favorisce l'attivazione della via di NF- κ B (Grabowska et al., 2017). La ridotta efficacia dei

processi degradativi, tra cui l'autofagia, comporta l'accumulo di vari tipi di molecole che, nel tempo, diventano altamente insolubili (Groh et al., 2017). Ad esempio, sono noti gli accumuli di lipofucsina, un aggregato fluorescente composto da lipidi, metalli e proteine ad errato *fold*ing, la cui comparsa è tipica del *brain aging* (Moreno-Garcia et al., 2018). Il rallentamento dei fenomeni di autofagia è accompagnato da una disfunzione a carico dei lisosomi, di cui aumenta la permeabilità di membrana, con peggioramento della fragilità strutturale; vengono rilasciati in ambito citosolico enzimi litici, tra cui la catepsina D (Gomez-Sintes et al., 2016). Il fenomeno della "lipidazione" è un meccanismo precoce alla base dell'assemblaggio dell'autofagosoma, si tratta della coniugazione di LC3-I (*microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain*) e di un'unità di fosfatidiletanolamina a formare il fattore LC3-II maturo, tipico della membrana dell'autofagosoma (Yoshii and Mizushima, 2017). In questo processo sono coinvolte anche le proteine ATG (*AuThophaGy*), la cui funzione primaria è sostenere il trasporto assonale mediato dai microtubuli, che nella senescenza cellulare può risultare compromesso. Per queste ragioni, le cellule neuronali senescenti possono sviluppare rigonfiamento dell'assone (Leeman et al., 2018). Il blocco dell'autofagia da un lato sembra sostenere l'attività della SA- β -gal, mentre dall'altra limita il fenotipo SASP, perché riduce il rilascio di amminoacidi e metaboliti liberi. Nel fenotipo SASP, la sintesi dei secreti è controllata dalla via di mTOR (*mechanistic Target Of Rapamycin*, precedentemente *mammalian Target Of Rapamycin*) e dal relativo complesso mTORC1 (Narita et al., 2011). In ultima, anche il blocco dei sistemi degradativi sembra attivare la via della neuroinfiammazione mediata da NF- κ B, in questo caso attraverso la stabilizzazione del fattore di trascrizione GATA4 (Kang et al., 2015).

Così come diversi altri meccanismi molecolari di invecchiamento descritti in precedenza, anche la senescenza cellulare converge nella via della neuroinfiammazione, sia grazie al fenotipo SASP, che favorisce il rilascio di citochine pro-infiammatorie, sia attraverso l'esposizione di antigeni riconosciuti come DAMPs (Franceschi et al., 2017). I DAMPs sono pattern molecolari associati a danno tissutale, riconosciuti dalle cellule dell'immunità innata come stimolo alla loro attivazione, derivano da detriti cellulari o proteine danneggiate che vengono esposte, oppure possono essere rilasciati in ambito extracellulare, sia passivamente in forma libera, sia entro le vescicole extracellulari (Collett et al., 2018; Katsumi et al., 2019; Marcoux et al., 2019). Queste vescicole sono prodotte in grande quantità nelle cellule senescenti, come tentativo di ripulirle da materiale indesiderato non degradabile, a causa del blocco dei processi degradativi (Eitan et al., 2016). Il fenotipo SASP conduce alla produzione di IL-6, citochine e chemochine, che possono indurre la senescenza anche in cellule prossimali sane, nel cosiddetto *bystander effect* od effetto spettatore (Moreno-Blas et al., 2019). Tipi cellulari diversi contribuiscono in modo differente alla neuroinfiammazione: gli astrociti attivano le vie di regolazione di NF- κ B e di C/EBP (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein*) (Cardinaux et al., 2000) secernendo anche il fattore HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) (Davalos et al., 2010), mentre la microglia secerne IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Sierra et al., 2007). La via di C/EBP conduce alla produzione di TGF β 1, che deprime la proliferazione astrocitaria, di GFAP, già

citato come importante componente del citoscheletro e di MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), con funzione di recluta di monociti nel SNC (Lindholm et al., 1992; De Sampaio e Spohr et al., 2002). La via di HMGB1 stimola la secrezione di fattori pro-infiammatori specifici, come la metalloproteinasi-9 di matrice e la ciclossigenasi-2 (Pedrazzi et al., 2007).

1.9 BIOMARCATORI DI INVECCHIAMENTO CEREBRALE

L'invecchiamento è un processo intrinsecamente legato all'età anagrafica del singolo individuo, ma non in modo così banale come ci si potrebbe aspettare. L'età anagrafica può essere distinta in molti casi dall'età biologica, poiché esistono profonde variazioni nella suscettibilità genetica e nell'esposizione a fattori di rischio ambientali da individuo ad individuo e questo si traduce in differenze nei processi cellulari e tissutali di invecchiamento, con ricadute visibili sul fenotipo (Higgins-Chen et. al, 2021). Quantificare l'età biologica di una persona è un'esigenza fondamentale in qualunque studio che riguardi il *brain aging* o l'insorgenza di patologie neurodegenerative, in particolare quando si vuole valutare l'effetto migliorativo o peggiorativo su questi di un certo fattore di esposizione. Per queste ragioni, una branca di ricerca si è soffermata sull'individuazione di marcatori biologici affidabili per la stima dell'età biologica. I biomarcatori di seguito descritti sono utilizzati in modelli di *machine learning* o con altri sistemi computazionali che possano analizzare efficacemente moli importanti di dati, individuando gli eventuali *trend* di interesse. I marcatori possono essere suddivisi in *epigenetic clocks* e *proteomic clocks*. Gli *epigenetic clocks* si basano sullo studio di specifici siti di metilazione del DNA, coinvolti nella regolazione dell'espressione genica. La metilazione del DNA comporta la spiralizzazione della cromatina, con conseguente inaccessibilità agli enzimi coinvolti nella trascrizione. All'aumentare dell'età, il livello di metilazione del DNA cala globalmente, ma in alcuni specifici siti promotoriali, paradossalmente aumenta, diminuendo l'espressione dei relativi geni (Raj and Horvath, 2020). Diversi orologi epigenetici sono stati messi a punto confrontando il livello di metilazione di batterie di loci genici regolatori. Gli orologi epigenetici possono essere messi a punto analizzando il DNA prelevato da cellule ematiche, si ottiene un buon potere predittivo sia sull'invecchiamento generale, sia su quello cerebrale specifico, ma con un approccio indiretto. L'età epigenetica delle cellule ematiche risulta essere significativamente correlata con una serie di alterazioni morfologiche encefaliche tipiche dei fenomeni di invecchiamento, tra cui la perdita di volume, la degenerazione della materia grigia e di quella bianca, la formazione di WMHs e di alterazioni del letto vascolare dell'organo, con conseguenza ultima nella perdita delle capacità cognitive (Hodgson et al., 2017; Proskovec et al., 2020). L'età epigenetica può essere misurata anche presso il tessuto nervoso, ove esistono diversi loci di regolazione riconosciuti come particolarmente rilevanti. Un sito cruciale nella stima dell'età biologica di neuroni e cellule gliali è ELOVL2 (Liu et al., 2020), che codifica per un'elongasi necessaria alla sintesi degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena, in particolare del DHA (acido docosaesaenoico). L'acido docosaesaenoico ha ruoli cruciali nella formazione delle membrane neuronali, nella regolazione

della sopravvivenza cellulare, nella modulazione della plasticità sinaptica e nella riduzione dei fenomeni neuroinfiammatori, come sarà approfondito nel secondo capitolo di questo elaborato (Weiser et al., 2016; Talamonti et al., 2020). Anche il gene SST della somatostatina risulta importante, poiché la SST agisce da neuromodulatore nei neuroni GABAergici inibitori, la cui riduzione di attività è già stata evidenziata come segno di invecchiamento (Wang et al., 2018; McKinney et al., 2015; Urban-Ciecko et al., 2016). Un ulteriore sito di metilazione importante riguarda le zone regolatorie del PRC2 (*Polycomb Repressor Complex-2*), che è un regolatore della spiralizzazione della cromatina presso geni chiave, connessi ai processi di crescita cellulare e mantenimento dell'omeostasi nel tessuto (Yang et al., 2016; Teschendorff et al., 2020; Booth et al., 2016). Un approccio più recente nella stima dell'età biologica dell'individuo riguarda l'impiego di dati provenienti da studi su database di proteomica, con diversi vantaggi interessanti. In primis, il proteoma ematico contiene proteine che provengono da diversi distretti corporei, quindi scegliendo il marcatore adatto è possibile monitorare lo stato di salute di ciascuno di questi, inoltre la componente proteica ematica è facilmente relazionabile ai processi degenerativi in atto nei distretti di interesse e la modifica farmacologica nell'attività delle proteine è più facilmente e direttamente implementabile rispetto ad un approccio di tipo epigenetico (Schaum et al., 2020). Molte proteine sono state relazionate, nel tempo, a fenomeni di *brain aging*, non sorprendentemente spesso esse sono marcatori di attività del sistema immunitario. Il proteoma ematico mostra cambiamenti repentini ricorrenti, noti come *aging waves* attorno alle età di 34, 60 e 78 anni (Lehallier et al., 2019). Studiare gli eventi che alterano il proteoma all'età dei 60 anni può aiutare a riconoscere i più significativi marcatori di invecchiamento. Un'anomala crescita si riconosce per le proteine connesse alla via di biosegnalazione del recettore Eph e del suo agonista endogeno, l'ephrina (Dines and Lamprecht, 2016). Questa via regola la dipendenza da contatto nei processi di crescita e migrazione cellulare, con conseguenze sulla plasticità sinaptica e sulla neurogenesi. Secondariamente, alterazioni si riconoscono a carico della pleiotropina, prodotta a livello dei periciti della BEE con funzioni pleiotropiche nella regolazione della crescita, della migrazione e della sopravvivenza cellulare (Nikolakopoulou et al., 2019).

2 INTEGRATORI ALIMENTARI

Gli integratori alimentari si basano su una o poche famiglie di molecole, spesso di origine naturale e principalmente vegetale che, insieme a una serie di eccipienti, vanno a costituire il prodotto. Questo si configura come un supplemento mirato a integrare dei componenti che si ritiene abbiano un effetto positivo per certe funzioni dell'organismo. Stanti queste caratteristiche basilari, per investigare l'efficacia di questi prodotti, è possibile svolgere non solo studi *in vivo* su modelli animali e clinici sull'uomo, bensì anche *in vitro*, su colture cellulari. In Italia, la commercializzazione di integratori alimentari è controllata dal Ministero della Salute ed in particolare dalla direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione. La commercializzazione di un nuovo integratore deve essere sempre notificata al Ministero, il quale non deve fornire un'autorizzazione all'immissione in commercio, ma si occupa di sorvegliare attivamente questo settore del mercato alimentare. A livello europeo, l'ente regolatorio di riferimento è l'EFSA (*European Food Safety Authority*), istituita nel 2002 e avente attuale sede nella città di Parma.

La diffusione mondiale di una dieta occidentale, basata sul consumo di alimenti ultra-processati, ricchi di carboidrati raffinati e grassi saturi, nonché su un ridotto consumo di vegetali, ha condotto ad una diminuzione nell'apporto dietetico medio di alcuni importanti nutrienti. La diffusione di questo modello dietetico è comunemente associata all'aumento nella prevalenza di condizioni patologiche, come l'obesità, il diabete, il cancro e le malattie cardiovascolari, ma anche di disordini nella salute del cervello. Si ritiene che tali condizioni siano da imputare sia all'eccessiva introduzione di alcuni nutrienti, sia alla carenza di altri, motivo per cui l'impiego di integratori alimentari appare una possibile soluzione per prevenire o rallentare la comparsa di tali affezioni, oppure per ostacolarne la progressione una volta presenti. È noto che una bilanciata disponibilità di nutrienti è essenziale per preservare la funzionalità neuronale fino alla tarda età, mentre alcune carenze e deprivazioni, già a livello pre-natale, ma anche post-natale favoriscono la compromissione delle funzionalità cognitive e l'insorgenza di malattie neurodegenerative (Tomi et al., 2013). Di seguito saranno trattate alcune famiglie di sostanze che hanno mostrato di migliorare i fenomeni di *brain aging* quando somministrate in forma di integratori alimentari, mettendone in evidenza i potenziali meccanismi d'azione molecolari ed i processi di invecchiamento su cui agiscono.

2.1 ACIDI GRASSI POLINSATURI

Gli acidi grassi polinsaturi o PUFAs (*Poly-Unsaturated Fatty Acids*) sono nutrienti lipidici essenziali per il mantenimento dell'omeostasi metabolica periferica e centrale; essi comprendono anche gli acidi grassi omega-3 a lunga catena, cioè l'acido docosaesaenoico (DHA) e l'acido eicosapentaenoico (EPA), che possono derivare dall'elongazione di catena ed insaturazione dell'acido α -linolenico (ALA) (vedasi Figura 13). Questi acidi grassi sono noti come omega-3, per la presenza di un'insaturazione tra il quartultimo ed il terzultimo carbonio della catena e sono considerati essenziali nella dieta umana, l'ALA non può essere

sintetizzato come tale nell'organismo, mentre le vie che lo convertono in EPA e DHA non sono in grado di soddisfare completamente il fabbisogno giornaliero di queste sostanze. L'ALA deriva principalmente da fonti vegetali e dai relativi oli, mentre EPA e DHA sono contenuti nel grasso del pesce azzurro, ma è comune la loro presenza in integratori alimentari. In commercio sono disponibili sia integratori alimentari che contengono olio di pesce purificato e ricco di acidi grassi essenziali, sia integratori che apportano EPA e DHA in forma sintetica.

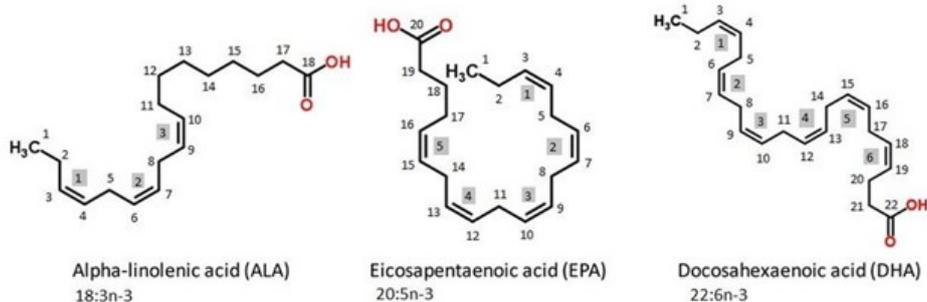


Figura 13: struttura chimica degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena, i carboni sono numerati a partire dal gruppo metilico di coda, i numeri indicati nei quadrati grigi indicano il numero e la posizione dei doppi legami (Moreno et al., 2012).

Un aspetto significativo riguarda il bilanciamento tra i livelli di acido α -linolenico e acido linoleico presenti nelle membrane cellulari. L'acido linoleico è il capostipite della famiglia degli acidi grassi omega-6 e viene facilmente convertito in acido arachidonico, a sua volta appartenente alla famiglia degli omega-6, in una via biologica ad elevata attività. A partire dall'acido arachidonico, vengono sintetizzati i mediatori dell'infiammazione eicosanoidi; la via di sintesi degli eicosanoidi è una complessa cascata in cui intervengono diverse famiglie di enzimi, la cui illustrazione formale esula dagli scopi del presente lavoro, tuttavia è importante ricordare che molti dei derivati sintetizzati in questa via hanno un effetto pro-infiammatorio. È possibile ipotizzare che un adeguato *intake* giornaliero di acidi grassi omega-3 conduca ad una loro maggiore espressione in membrana, cui segue una parallela riduzione nei livelli di omega-6 ed in particolare di acido arachidonico. Diminuendo, con meccanismo competitivo, i livelli di acido arachidonico, gli omega-3 riducono le concentrazioni di metaboliti eicosanoidi che derivano dal metabolismo di questa molecola. Ne consegue una riduzione in quei fenomeni neuroinfiammatori precedentemente evidenziati come eventi chiave nel *brain aging* (Simopoulos, 2002).

Studi svolti su modello umano hanno evidenziato che la supplementazione dietetica di PUFAs, in particolare EPA e DHA, è in grado di prevenire lo sviluppo di atrofia ippocampale e la comparsa di *white matter hyperintensities*, diminuire la probabilità di sviluppare disturbi neurodegenerativi e ridurre le perdite funzionali nella progressione della malattia, quando la stessa sia già presente (Haast and Kiliaan, 2015). Il volume totale di alcune aree critiche, come l'ippocampo, il giro cingolato del sistema limbico

e la corteccia orbito-frontale appaiono meglio preservati in individui che supplementano la propria dieta con olio di pesce (Salem et al., 2015). Uno studio su modello animale ha osservato un peggioramento dell'eccitotossicità in roditori dieteticamente privati di omega-3, con conseguente disfunzione delle sinapsi glutammatergiche e ridotto *uptake* del glutammato presente a livello extracellulare, negli astrociti dell'area ippocampale CA1 (Latour et al., 2013). Queste evidenze sono molto rilevanti considerando il ruolo dell'eccitotossicità del glutammato nell'invecchiamento del cervello.

I PUFAs agiscono come ligandi esogeni dei fattori di trascrizione regolati dai recettori di proliferazione perossisomiale PPAR- α e PPAR- γ , intervenendo su una serie di vie di *signaling*, tra cui la via infiammatoria di NF- κ B ed il conseguente rilascio di TNF- α ed IL-1 β . Le vie mediate dai PPAR controllano processi coinvolti in diversa misura nei fenomeni di invecchiamento, tra cui la proliferazione dei perossisomi, l'ossidazione degli acidi grassi, la sensibilità insulinica dei tessuti rispondenti all'ormone, la differenziazione degli adipociti (Nagasawa et al., 2009; Xue et al., 2012). L'isoforma PPAR- γ ha ruoli di controllo a livello encefalico, tra cui la regolazione dell'attivazione della microglia, della sintesi di guaina mielinica, della risposta mediata dalle *heat shock proteins* e della morte cellulare. Nello specifico, la via del PPAR- γ riduce la sintesi di ossido nitrico e prostaglandina E2, *down-regolando* la via di NF- κ B.

L'acido docosaesaenoico può essere convertito in neuroprotectina D1 (NPD-1), un metabolita cui sono attribuite funzioni neuroprotettive. In modello animale la supplementazione dietetica di olio di pesce ha portato ad un aumento nei livelli di DHA libero e NPD-1 nell'encefalo, da cui deriva una migliore regolazione nell'attività dei geni della famiglia di Bcl-2 ed un più efficiente controllo della funzione apoptotica (Afshordel et al., 2015).

Oltre a queste attività specifiche sul SNC, gli omega-3 hanno altri effetti positivi sul metabolismo sistemico. In soggetti che seguono una dieta occidentale, un *intake* maggiorato di omega-3 può prevenire le conseguenze deleterie di un eccessivo consumo di acidi grassi saturi e zuccheri raffinati, tra cui l'obesità, la sindrome metabolica e le patologie ad esse correlate. Tra i vari processi di danno, a carico delle cellule beta del pancreas può svilupparsi la glicolipotossicità, essa deriva da un'azione sinergica degli alti livelli di carboidrati ed acidi grassi saturi introdotti con la dieta, che causa la morte per apoptosi delle cellule beta, esponendo allo sviluppo di diabete di tipo II (El-Assaad et al., 2003). La supplementazione dietetica di omega-3 migliora il bilancio lipidico ematico, riducendo i valori di trigliceridi, colesterolo totale e lipoproteine a bassa densità (LDL) ed aumentando quelli di lipoproteine ad alta densità (HDL), anche in questo caso antagonizzando gli effetti negativi ed anti-salutistici degli acidi grassi saturi. Questi meccanismi dimostrano una forte correlazione tra integrazione dietetica di omega-3 e prevenzione di insulinoresistenza e diabete di tipo II, ricordando che lo sviluppo di insulinoresistenza a livello neuronale è un tipico segno di *brain aging* e la sua risoluzione sembra prevenire lo sviluppo di *deficit* cognitivi.

Gli acidi grassi omega-3 a lunga catena (LC- ω 3-FA) possono supportare la plasticità sinaptica, migliorando la funzionalità neuronale ed aumentando l'espressione di proteine del bottone sinaptico (Cansev

and Wurtman, 2007), con conseguenze positive sulla struttura della sostanza grigia neuronale. I LC- ω 3-FA supportano l'integrità della sostanza bianca, riducendo la comparsa di WMHs (Conklin et al., 2007) e preservano il volume totale dell'encefalo (Tan et al., 2012). Dal punto di vista funzionale, i LC- ω 3-FA migliorano le capacità esecutive e le abilità di apprendimento (Hooijmans et al., 2012), prevenendo l'insorgenza di forme di demenza (Barberger-Gateau et al., 2007). A livello cardiovascolare, il DHA è in grado di migliorare lo spessore delle tonache intima e media della carotide, un parametro noto come CIMT, che è un marcatore surrogato di aterosclerosi, patologia vasale correlata con *brain aging* e malattia del SNC. Uno studio del 2013 (Witte et al., 2014) ha verificato gli effetti positivi di un'integrazione quantitativamente importante di omega-3, per un ammontare di 2200 mg/giorno, divisi in quattro somministrazioni, in individui di età avanzata per un tempo complessivo di 26 settimane. Gli effetti positivi di questi importanti nutrienti sono stati valutati non solo sulle capacità cognitive e mnemoniche dell'individuo, ma anche sulla struttura dell'encefalo, sull'integrità di sostanza grigia e sostanza bianca e su alcuni parametri ematologici e biometrici di base. Lo studio è stato svolto con direzione anterograda ed approccio prospettico, in doppio cieco, i pazienti sono stati analizzati prima ed dopo il *follow-up*. Le capacità esecutive, mnemoniche, sensori-motorie e di attenzione sono state valutate ricorrendo a tecniche per stimare la prestazione neuropsicologica, che hanno consentito di calcolare dei punteggi complessivi. Metodi di diagnostica per immagini non invasiva sono stati adoperati per valutare le condizioni dei tessuti e dei vasi del SNC di ogni paziente, misurando, tra gli altri, i parametri CIMT, FA, MD e RD. Per concludere, sono stati misurati svariati parametri ematici (profilo lipidico, profilo glucidico, BDNF, IGF-1, PCR, TNF- α e IL-6) e biometrici (altezza, peso, percentuale di massa grassa). Prelievi di sangue ad hoc hanno permesso di calcolare l'*omega-3 index*, pari alla percentuale cumulativa di EPA e DHA nel totale degli acidi grassi nella membrana eritrocitaria, misurata in gas-cromatografia.

Si è osservato un netto miglioramento delle capacità esecutive, stimato in un +26% (vedasi Figura 14), mentre lo score mnemonico complessivo non ha mostrato un cambiamento significativo. Restringendo l'analisi ai soli soggetti che hanno risposto in modo più evidente all'integrazione, emerge un ruolo dei LC- ω 3-FA nel consolidamento della memoria. Non si sono rilevate modificazioni nella risposta sensori-motoria e nell'attenzione. Analizzando i dati strutturali, l'aumento di anisotropia frazionaria ed il calo nei valori di diffusività media e radiale suggeriscono un miglioramento nell'integrità della sostanza bianca. Le aree più coinvolte da questi cambiamenti positivi sono i fasci del corpo calloso anteriore sinistro, che comunica con le aree frontali di ambo gli emisferi, che sono le aree più direttamente coinvolte nelle funzioni esecutive (Turner and Spreng, 2012). Per la materia grigia si osserva un aumento di volume in alcune aree critiche (ippocampo sinistro, precuneo, lobo temporale superiore, lobo parietale inferiore, giro post-centrale, giro medio-temporale di destra). A livello di volume encefalico totale, nel gruppo di controllo si osserva una lenta e progressiva atrofia, mentre nel gruppo oggetto di supplementazione questo fenomeno non è presente (vedasi Figura 15).

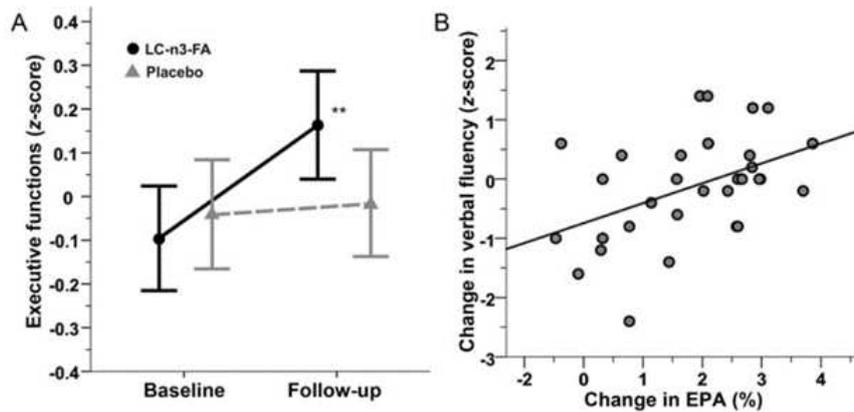


Figura 14: A sinistra, variazione nelle capacità esecutive dopo 26 settimane di supplementazione di LC- ω 3-FA o placebo, si può apprezzare un netto miglioramento nel gruppo sperimentale. A destra, confronto tra la fluenza verbale, la cui valutazioni rientra nelle abilità esecutive e la concentrazione di EPA nelle membrane eritrocitarie, che rispecchia il consumo dietetico di LC- ω 3-FA (Witte et al., 2014).

A livello cardiocircolatorio, il parametro CIMT ha riportato una riduzione del 4,4%, significativa solo nel gruppo femminile, mentre è calata la pressione ematica diastolica, con miglioramento dei parametri lipidici e glucidici. Gli effetti anti-aterogenici degli omega-3 sono da attribuire sia alla riduzione nel rilascio di citochine pro-infiammatorie, sia all'*up-regulation* dell'ormone adiponectina, che contrasta l'aumento di peso e lo sviluppo della sindrome metabolica (Fotuhi et al., 2009). Si è misurata una riduzione dell'insulinemia, a suggerire una migliorata sensibilità dei tessuti target all'ormone. I livelli di BDNF sono risultati significativamente maggiori nel gruppo oggetto di supplementazione di omega-3, anche perché alti livelli di DHA possono favorire una maggiore sintesi di questo fattore di crescita a livello dell'ippocampo (Wu et al., 2004). Nel SNC il DHA viene biosintetizzato dagli astrociti a partire dall'EPA e rilasciato nello spazio extracellulare, dove può svolgere le sue funzioni (Moore et al., 1991).

2.2 VITAMINA C

La vitamina C o acido ascorbico è una sostanza strutturalmente correlata agli zuccheri semplici, ma la cui produzione endogena è compromessa nell'uomo e nei primati per la mancanza dell'enzima L-gulonolattone ossidasi, che converte il precursore L-gulonolattone in acido ascorbico vero e proprio. La sua struttura molecolare è riportata in Figura 16. La vitamina C è un nutriente essenziale nell'uomo, anche se per la sopravvivenza sono sufficienti 10 mg/giorno (Hodges et al., 1971), mentre negli integratori alimentari disponibili in commercio le quantità sono molto più significative, tra i 500 mg ed i 1000 mg per singola unità posologica.

La vitamina C è attivamente trasportata nel cervello grazie alla proteina SVCT2 (*Sodium-Vitamin*

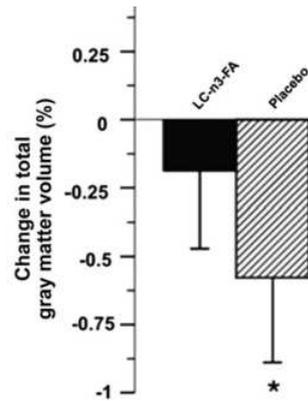


Figura 15: Variazione del volume globale di sostanza grigia dopo 26 settimane di trattamento con LC- ω 3-FA o placebo, nel gruppo di *testing* si apprezza una evidente riduzione del tasso di atrofia (Witte et al., 2014).

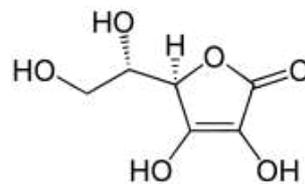


Figura 16: Struttura chimica dell'acido ascorbico nella sua forma ridotta (Yikrazuul).

C co-Transporters 2) (Harrison and May, 2009) ed è qui impiegata per contrastare lo stress ossidativo e neutralizzare i ROS prodotti, specialmente a causa dell'attività delle cellule immunitarie. Eventi cerebrovascolari come *mini-stroke* ed ischemie transitorie comportano un aumento dello stress ossidativo nel tessuto cerebrale, anche a causa dei fenomeni di riperfusione delle aree coinvolte. Il fatto che questi eventi si associno ad un aumento di assorbimento di vitamina C nel SNC ed ad una maggiore espressione di SVCT2 dimostra il ruolo di antiossidante di primaria importanza che questo nutriente riveste nell'encefalo (Gess et al., 2011). Vari studi svolti su modello animale hanno evidenziato che la vitamina C agisce prevenendo il danno cerebrovascolare e la distruzione della BEE che si possono verificare nel corso dei processi di *brain aging* (Hall et al., 2010). In uno studio svolto sui ratti, un'iniezione intraperitoneale di vitamina C ad alto dosaggio (500 mg/kg p.c.) ha evitato il danneggiamento del sistema somatosensoriale a seguito di un insulto compressivo a livello corticale (Lin et al., 2010).

2.3 AMMINOACIDI E GLUTATIONE

La N-acetilcisteina (NAC) è il derivato N-acetilato dell'amminoacido cisteina, è utilizzata come farmaco per la sua azione mucolitica, ma ha anche un interessante potere antiossidante, che ne spiega sia l'uso antidotale nelle intossicazioni da paracetamolo, sia il comune impiego in integratori, tra cui quelli per la prevenzione e per il trattamento del *brain aging*. Gli integratori alimentari possono contenere sino a 600

mg di NAC per singola unità posologica e sono la principale fonte alimentare di questa sostanza, che è contenuta in piccole quantità in alcuni vegetali, come aglio e cipolla.

La NAC viene metabolizzata nell'organismo producendo cisteina, la cui importanza biologica è in gran parte legata alla presenza, nella struttura molecolare, di un gruppo tiolico, contraddistinto da un elevato potenziale riducente. La cisteina fa parte della struttura del glutatione (GSH), visibile in Figura 17. Il GSH è un tripeptide contenente glicina, cisteina ed acido glutammico. Come precursore di GSH, la NAC si inserisce nei meccanismi di controllo e riduzione dello stress ossidativo cellulare, si tratta di vie biochimiche essenziali per contenere il danno da ROS, che è un tipico meccanismo di invecchiamento dell'encefalo. Inoltre, la NAC può penetrare nel SNC attraverso la BEE ed interagire direttamente con i ROS e con i radicali liberi, detossificandoli con azione diretta (Dekhuijzen, 2004; Bavarsad et al., 2014).

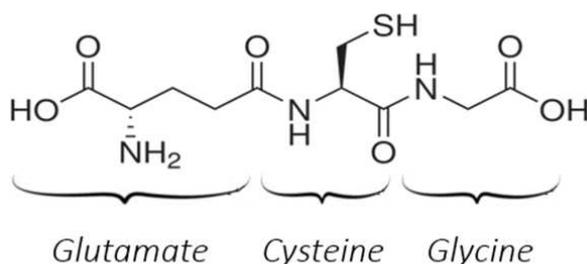


Figura 17: Struttura chimica del glutatione e relativa composizione amminoacidica (Innbiotecpharma.com).

Il GSH ha una serie attività fisiologiche utili, non solo prende parte ai sistemi di detossificazione dei ROS e di contenimento dello stress ossidativo, ma anche nella regolazione della proliferazione cellulare, dei processi apoptotici e nel mantenimento della regolare struttura delle proteine cellulari, attraverso la stabilizzazione dei gruppi tiolici in forma ridotta (Dringen, 2000). Presso il SNC, il GSH è particolarmente concentrato nelle cellule gliali (Rice and Russo-Menna, 1998). L'importanza del ruolo del glutatione nel contenimento dello stress ossidativo si può apprezzare considerando che una deplezione di GSH, anche a livelli non sufficienti a produrre tossicità evidente, può alterare l'attività delle vie NO-mediate e favorire l'accumulo di proteine nitate, un segno tipico di alcune malattie neurodegenerative (Acquilano et al., 2011). Uno studio recente, condotto attraverso una sofisticata tecnica strumentale non invasiva, nota come spettroscopia protonica di risonanza magnetica, ha osservato nell'encefalo di pazienti anziani una deplezione di GSH ed un aumento nei livelli di lattato, senza visibili cambiamenti nella concentrazione encefalica di vitamina C (Emir et al., 2011).

Di seguito si propone un approfondimento del ruolo degli integratori di glicina ed N-acetilcisteina nella prevenzione del *brain aging*, evidenziando le conseguenze del loro impiego a carico dei processi cellulari dipendenti dal metabolismo del glutatione. La disponibilità di glicina risulta essere lo step limitante per la sintesi di GSH (McCarty et al., 2018; Sekhar et al., 2011). Il glutatione non può essere supplementato con

la dieta come tale, poiché è digerito a livello intestinale e non mostra alcuna biodisponibilità. È possibile la somministrazione nella via endovenosa come farmaco, tuttavia si tratta di un'operazione delicata che può ricadere nello sviluppo di stress riduttivo. Nel verme nematode *Caenorhabditis elegans* un'eccessiva somministrazione esogena di glutazione ha mostrato di peggiorare i fenomeni di invecchiamento (Gusarov et al., 2021). L'approccio farmacologico è poco fisiologico, visto che ogni cellula dovrebbe produrre le proprie riserve di GSH e non è previsto un sistema di *delivery* ematico per questo composto. La supplementazione di glicina ed N-acetilcisteina consente di aumentare i livelli di glutazione in modo equilibrato e nelle cellule di diversi tessuti, tra cui cuore, fegato, rene, muscolo scheletrico e globuli rossi (Kumar et al., 2022a, 2022b; Sekhar et al., 2021). Con questo approccio, più fisiologico, i livelli di GSH non aumentano mai oltre quelli che si osservano in individui giovani e lo stesso accade per il calo nella concentrazione di ROS.

In un recente studio (Kumar et al., 2023) svolto su topi invecchiati C57BL/6J, noti per condividere molti dei segni di invecchiamento tipici dell'uomo (Kumar et al., 2022a, 2022b; Nguyen et al., 2013), è stato valutato l'effetto di una supplementazione di 8 settimane di glicina ed N-acetilcisteina (GlyNAC), ciascuna nella dose di 1.6 mg/g. Le performance cognitive sono state valutate attraverso il *8-arm radial maze*, un test in cui viene valutato il comportamento del topo, liberato in una camera con 8 bracci uguali di cui solo uno contiene cibo. Vengono misurati il tempo impiegato per raggiungere il cibo ed il numero di errori precedenti alla sua individuazione. Al termine dello studio, i topi hanno subito eutanasia permettendo l'analisi autoptica di una serie di parametri. Si è provveduto a stimare i livelli cerebrali di glutazione totale (tGSH) e glutazione nella sua forma ridotta (rGSH), a partire da cui sono stati calcolati i livelli di glutazione ossidato (GSSH) per differenza. In seguito, è stata eseguita una respirometria ad alta-risoluzione, misurando il consumo di ossigeno del tessuto, dapprima in condizioni base e poi dietro impiego di una serie di inibitori degli enzimi respiratori. Infine, le concentrazioni di alcuni marcatori proteici di *brain aging* sono state quantificate con tecniche immunocromatografiche.

Le *performance* cognitive stimate attraverso *8-arm radial maze* sono risultate prevedibilmente peggiori nella coorte dei topi più vecchi, con un aumento del 100% nel tempo di completamento del test e del 50% nel numero di errori commessi, mentre la dieta standard non ha mostrato alcuna differenza significativa, a seguito di integrazione di GlyNAC si è misurata una diminuzione del tempo di completamento del test (42%) e del numero di errori commessi (33%). Il miglioramento non è stato tale da pareggiare i risultati del test sulla popolazione più giovane (vedasi Figura 18). I dati ottenuti su modello animale per l'incremento della *performance* cognitiva possono essere estesi all'uomo, anche ricordando l'esito di un piccolo studio su uomini anziani, che aveva osservato un miglioramento della performance cognitiva dopo una supplementazione di 24 settimane, che tendeva a revertire spontaneamente interrompendo l'uso di GlyNAC (Kumar et al., 2021). I livelli di tGSH e rGSH nel gruppo di controllo di topi invecchiati risultavano significativamente minori rispetto ai topi di giovane età (-69% in tGSH e -75%

in rGSH), la supplementazione di GlyNAC ha mostrato un aumento molto significativo su entrambi i parametri (+156% in tGSH e +204% in rGSH), senza osservare differenze in termini di glutazione ossidata (vedasi Figura 19). Gli step limitanti la biosintesi del glutatione sono legati all'azione delle subunità della glutammato-cisteina ligasi ad azione catalitica (GCLC) e modificatrice (GCLCM) a livello precoce, mentre tra gli enzimi tardivi, il più importante è la glutatione sintetasi (GSS). Il livello di espressione di questi enzimi nei topi che hanno subito supplementazione di GlyNAC è risultato nettamente maggiore ed indistinguibile da quello dei topi di giovane età.

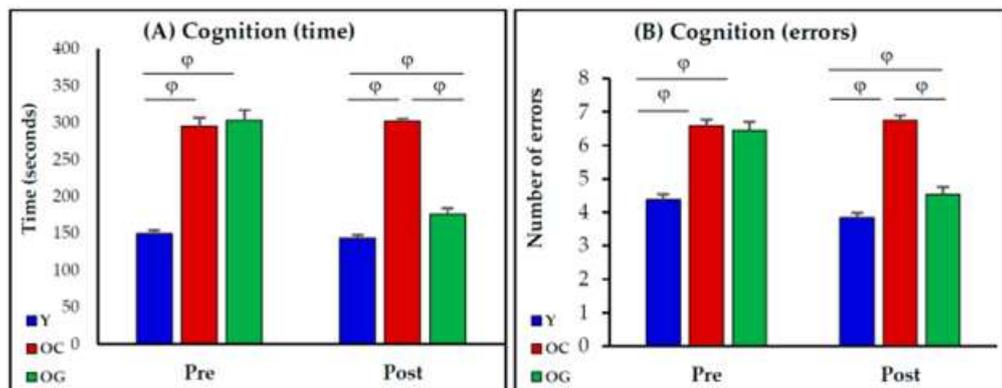


Figura 18: *Performance* cognitiva nel gruppo di controllo di topi giovani (Y), nel gruppo di controllo di topi di età avanzata (OC) e nel gruppo di *testing* (OG), stimata come tempo di completamento e numero di errori nello scolgimento del *8-arm radial maze*. È possibile osservare un evidente effetto migliorativo nel gruppo trattato con GlyNAC ($\varphi = p < 0.01$) (Kumar et al., 2023).

La supplementazione di GlyNAC ha comportato un miglioramento del metabolismo energetico neuronale, ad esempio aumentando l'espressione centrale di trasportatori GLUT1 e GLUT3, che risulta paragonabile a quella dei topi di giovane età. Inoltre, l'uso del supplemento dietetico è stata correlato ad una maggiore attività dei complessi della catena respiratoria e della ATP-sintetasi. Il livello di attività delle proteine mitocondriali è stato stimato misurando l'*oxygen consumption rate*, cioè il consumo di ossigeno in presenza di substrati ossidabili. Per visualizzare l'attività del singolo complesso proteico sono state impiegate alcune sostanze che agiscono da inibitori della cascata respiratoria a diversi livelli, confermando che il miglioramento dell'attività riguarda tutti e quattro i complessi. Le funzioni di biogenesi mitocondriale e mitofagia sono risultate potenziate dopo somministrazione di GlyNAC, con aumento dei marcatori PGC1 α e PINK1. Più in generale, l'autofagia in sé è risultata migliorata a seguito dell'uso di GlyNAC, con aumento nei livelli di LC3-I e LC3-II. L'impiego di GlyNAC ha mostrato di ridurre i fenomeni neuroinfiammatori, come dimostrano più bassi livelli di proteina traslocatrice TSPO, un comune marcatore. Questo miglioramento non dipende da un'azione a livello della microglia, ma da una diminuzione dei livelli centrali di ROS. Studi ulteriori, svolti su modello umano, hanno misurato anche

una riduzione nei livelli ematici di citochine pro-infiammatorie (Kumar et al., 2021, 2022b), confermando un miglioramento dei processi infiammatori anche in altri distretti dell'organismo. Infine, lo studio ha evidenziato che il supplemento dietetico di GlyNAC riduce i livelli di γ -H2AX, già citato come marcatore di danno genomico ed aumenta la concentrazione di alcuni fattori neurotrofici, in particolare BDNF, ma anche GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*) e NGF (*Nerve Growth Factor*).

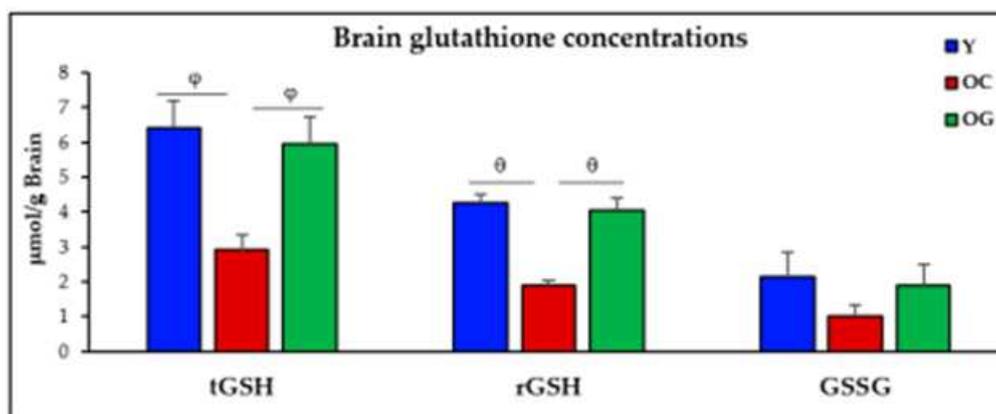


Figura 19: Concentrazione totale di glutatione e concentrazione delle sue forme ridotta ed ossidata nel gruppo di controllo di topi giovani (Y), nel gruppo di controllo di topi di età avanzata (OC) e nel gruppo di *testing* (OG), le differenze statisticamente significative sono evidenziate con $\varphi = p < 0.01$ o $\theta = p < 0.001$ (Kumar et al., 2023).

2.4 POLIFENOLI

Molti metaboliti secondari di origine vegetale mostrano, in studi *in vitro*, proprietà antinfiammatorie ed antiossidanti, che li rendono potenzialmente impiegabili nella prevenzione e nel trattamento del *brain aging*. La maggior parte di questi composti appartengono alla classe dei polifenoli. I polifenoli sono classificati sulla base della struttura chimica, distinguendo: acidi fenolici (acido gallico, acido caffeico, tirosolo ed idrossitirosolo), stilbeni (resveratrolo), lignani, tannini (composti polimerici di grandi dimensioni) e cumarine, ma la classe principale è quella dei flavonoidi. Questi ultimi si dividono in sottoclassi: flavanoli (quercetina), flavoni, flavanoni (naringenina, esperitina), isoflavoni, antocianine (tra cui le cianidine, di seguito ampiamente analizzate). Si riportano alcune immagini che mostrano la struttura chimica delle classi di composti citate, evidenziandone le similitudini e le differenze, si vedano le Figure 20 e 21. Infine, in Figura 22 è possibile osservare uno schema riassuntivo sulla sotto-classificazione dei flavonoidi. Molti polifenoli mostrano profonde problematiche di stabilità *in vivo* e biodisponibilità, spesso le concentrazioni adoperate negli studi disponibili in letteratura non sono paragonabili a quelle raggiungibili nel distretto ematico a seguito di un consumo alimentare, risultando mediamente cento volte superiori. Per

queste ragioni, i risultati degli studi che saranno descritti, pur potendo apparire molto significativi, non garantiscono l'efficacia d'uso di integratori contenenti queste sostanze.

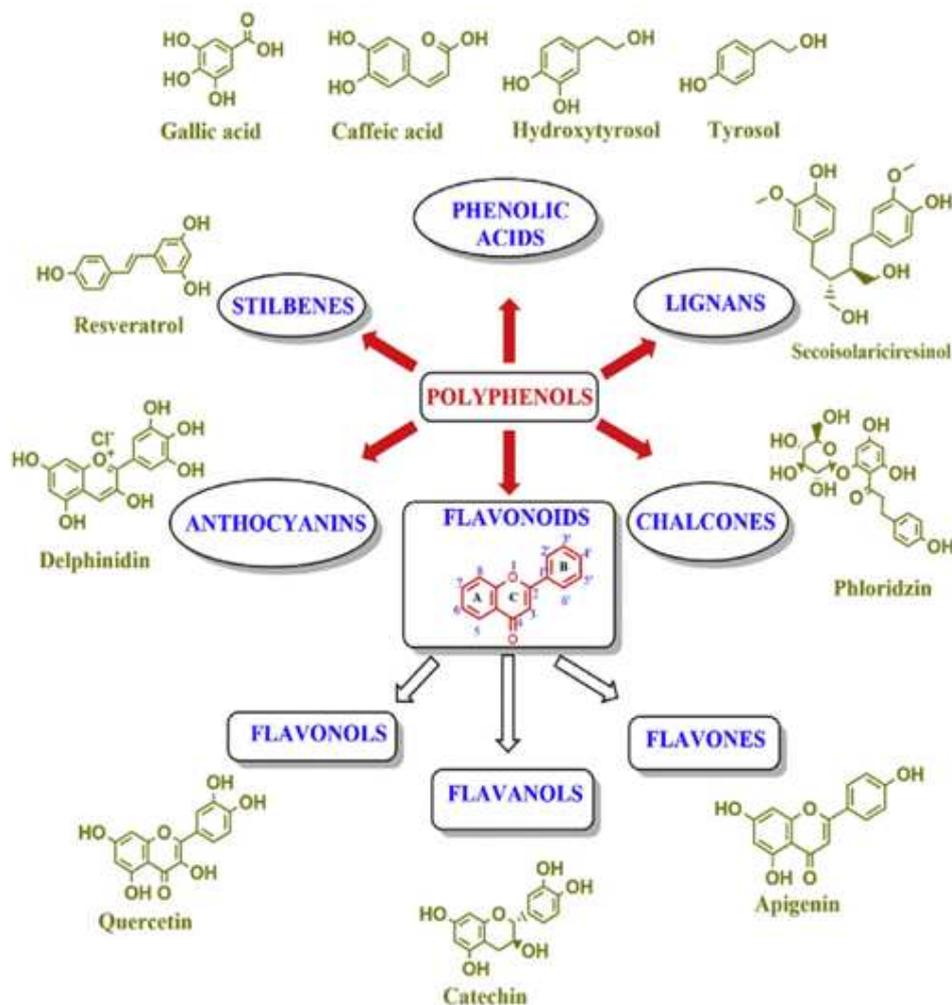


Figura 20: Struttura chimica delle principali classi di polifenoli e relativi esempi (Geraci, 2018).

I flavonoidi mostrano svariate attività neuroprotettive: possono comportarsi da *scavenger* di radicali liberi od attivare cascate di biosegnalazione cellulare (Mercer et al., 2005; William et al., 2004), tra cui quelle che regolano la funzione delle protein chinasi e delle chinasi lipidiche. I flavonoidi possono interagire con il metabolismo mitocondriale ed agire da agonisti dei recettori $GABA_A$, sia a livello del sito recettore delle benzodiazepine, sia presso ulteriori porzioni di legame. A livello neuronale, si osserva l'attivazione di *pathway* anti-apoptotici e di sopravvivenza cellulare, l'aumento delle difese antiossidanti e la riduzione della neurotossicità della proteina amiloide $A\beta$ (Williams et al., 2004; Williams and Spencer, 2012; Cox et al., 2015). In alcuni studi, i flavonoidi mostrano un'attività migliorativa nel circolo ematico cerebrale e periferico, con aumento della perfusione del SNC e stimolo all'attivazione neuronale e alla plasticità

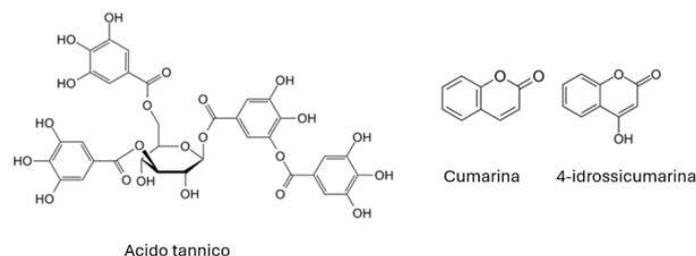


Figura 21: Struttura chimica di tannini e cumarine (Emeldir; Nono; Sobkowski).

sinaptica (Williams et al., 2015). La realizzazione di integratori che apportino elevate concentrazioni di flavonidi od altri derivati polifenolici non può prescindere dalla messa a punto di sistemi di *delivery* moderni, che favoriscano la biodisponibilità di queste molecole ed il superamento della BEE. Ad esempio, la curcumina in forma micellare mostra una biodisponibilità aumentata, sia presso il distretto ematico, sia presso quello cerebrale, di un fattore variabile tra le 10 e le 40 volte, raggiungendo concentrazioni potenzialmente interessanti da un punto di vista clinico (Williams et al., 2015). Si riporta, di seguito, un elenco non esaustivo di polifenoli che potrebbero avere un ruolo nella prevenzione e nel trattamento del *brain aging* (Williams et al., 2015).

- Il geniposide deriva dai frutti delle piante del genere *Gardenia*, un tempo impiegate nella medicina cinese tradizionale. Sembra potenziare la risposta all'insulina nell'encefalo, riducendo l'insulinoresistenza ed attivando il metabolismo energetico. Si ritiene che gli effetti del geniposide siano mediati dall'azione di agonista del recettore per il GLP-1 (Glucagon-Like-Peptide 1).
- L'ossimatrina si ricava dalla radice delle piante del genere *Sophora*, anch'essa nota nella medicina tradizionale cinese. Ha un'azione antiossidante ed antinfiammatoria a livello del SNC, potendo ridurre il danno prodotto da un'ischemia ipossica presso il tessuto nervoso.
- L'apocinina proviene dalla radice di *Picrorhiza kurroa*, impiegata nella medicina tradizionale indiana Ayurveda. Ha attività antinfiammatoria, riduce la produzione di ROS ed aumenta i livelli di glutathione. L'apocinina ostacola l'ossidazione del colesterolo, i cui derivati hanno azione pro-apototica.
- La curcumina, estratta dalla radice di *Curcuma longa*, proviene da Cina ed India, ma è oramai diffusa anche in Europa. Essa ha azione antinfiammatoria, riducendo la produzione di diverse citochine e chemochine, inoltre riduce l'attività delle cellule della microglia.
- I metaboliti dell'aglio comune (*Allium sativum*) comprendono la S-allil-cisteina, un composto con azione antiossidante ed antinfiammatoria, che stimola la via di NRF2 e l'allicina, che sembra intervenire sulla via della sfingosin-chinasi 2, con azione neuroprotettiva.

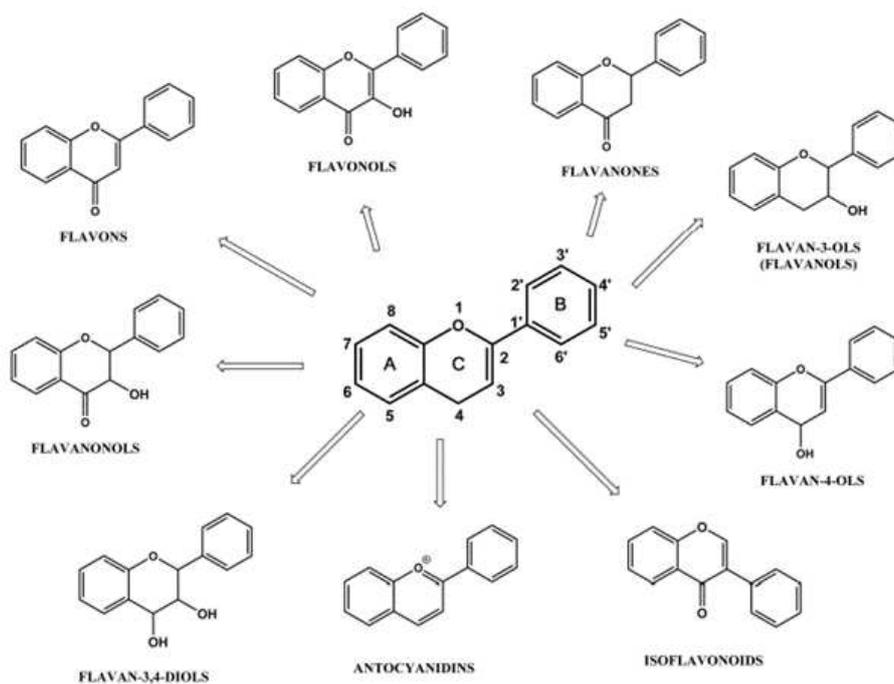


Figura 22: Struttura chimica delle diverse classi di derivati flavonoidi (Geraci, 2018).

- Tra i flavonoidi, la quercetina proviene da diverse fonti naturali, ha azione antinfiammatoria ed anti-ossidante, riducendo l'ossidazione delle proteine. Il 7,8-diidrossiflavone è in grado di simulare il ruolo endogeno del BDNF. L'epigallo-catechin-3-gallato (EGCG) è il principale flavonoide del tè verde, capostipite della famiglia delle catechine (epicatechina, gallocatechina, epigallocatechina, epicatechina-gallato), composti che superano la BEE e possono prevenire alcune forme di neurodegenerazione.
- La fisetina, proveniente da varie fonti vegetali, è un flavonoide. Oltre ad avere le consuete attività anti-ossidante ed antinfiammatoria, essa migliora il circolo ematico cerebrale. Una volta introdotta con la dieta, la fisetina si concentra rapidamente nel distretto vascolare, per poi essere lentamente rilasciata verso il parenchima dell'organo.

Tra i composti polifenoli, un *focus* deve essere riservato al resveratrolo. Il resveratrolo, o 3,5,4'-triidrossi-*trans*-stilbene, è un polifenolo a struttura stilbenica, che si trova naturalmente in diverse fonti vegetali ed è comunemente impiegato come componente di svariati integratori alimentari. La sua struttura molecolare è riportata in Figura 23. In letteratura sono disponibili diversi studi che hanno evidenziato effetti positivi nell'uso di integratori di resveratrolo, tra cui il miglioramento della memoria spaziale (Dal-Pan et al., 2011) ed dell'apprendimento (Kim et al., 2007). Uno studio del 2014 ha valutato gli effetti della supplementazione dietetica di resveratrolo nella struttura e nella funzione dell'encefalo e ha misurato

una serie di parametri ematici e biometrici, legati al rischio cardiovascolare e cerebrovascolare (Witte et al., 2014b).

Il meccanismo d'azione del resveratrolo non è completamente chiaro, si pensa che possa intervenire su diversi fenomeni che si correlano al *brain aging*: ridurre l'attivazione abnorme della microglia, regolare la via delle MAPK, la via di sopravvivenza cellulare della sirtuina (SIRT1) e quella del fattore di trascrizione nucleare NRF2, promuovere un effetto antinfiammatorio ed antiossidante. Il resveratrolo migliora alcuni parametri cardiovascolari, tra cui pressione ematica, colesterolemia e processi aterogenetici (Miatello et al., 2005; Do et al., 2008). A livello metabolico, il resveratrolo riduce le reazioni di glicazione ed il danno ossidativo a carico del DNA che ne consegue (Mizutani et al., 2000).

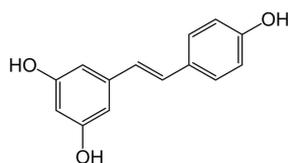


Figura 23: Struttura molecolare del resveratrolo (Fvasconcellos).

Lo studio, controllato con placebo ed in doppio cieco, è stato condotto supplementando per 26 settimane 200 mg di resveratrolo e 320 mg di quercetina, in quattro somministrazioni giornaliere, su popolazione sana e di età avanzata. La quercetina è stata impiegata per promuovere l'assorbimento del resveratrolo, che è il suo principale problema. Prima e dopo il *follow-up* è stato condotto un test per la memoria, l'*Auditory Verbal Learning Test* (AVLT). La struttura del SNC, con particolare attenzione per le aree ipocampali, è stata valutata attraverso tecniche di risonanza magnetica nucleare; infine sono stati misurati parametri ematici e biometrici. È stato evidenziato un miglioramento significativo della memoria (si veda la tabella riportata in Figura 24 che esprime i risultati dell'AVLT), sostenuto da un aumento della connettività funzionale tra l'ippocampo e le aree corticali frontali, parietali ed occipitali. Tra i parametri ematici, si è evidenziato un aumento nei livelli di leptina ed una riduzione in quelli di emoglobina glicata HbA1c, mentre a livello biometrico è evidente la riduzione nella percentuale di grasso corporeo. Il miglioramento delle *performance* cognitive può essere spiegato da un aumento della perfusione centrale. Questo aspetto era già stato evidenziato in un piccolo studio del 2010, che si proponeva di valutare le conseguenze circolatorie di una singola dose di resveratrolo di 250 o 500 mg (Kennedy et al., 2010).

Un'altra categoria di derivati vegetali di particolare interesse è costituita dalle antocianine dell'*Aronia melanocarpa*, una pianta appartenente alla famiglia delle Rosacee. Si tratta di sostanze che possono superare apprezzabilmente la BEE e concentrarsi nel SNC, dove svolgono un'attività anti-ossidante, antinfiammatoria e neuroprotettiva, legata anche alla riduzione del danno genomico (Shih et al., 2010; Talavèra et al., 2005; Tarozzi et al., 2007; Varadinova et al., 2009; Yousuf et al., 2016). Questi composti interagiscono con la proteina codificata dal gene Klotho, un gene soppressore d'invecchiamento. In topi

Table 2. Memory performance according to the auditory verbal learning task dependent on group

Parameter (no. of words)	Resveratrol			Placebo		
	Pre	Post	<i>p</i>	Pre	Post	<i>p</i>
Retention	-2.2 ± 2.4	-1.3 ± 1.6	0.041^a	-2.0 ± 2.0	-2.4 ± 2.4	0.30 ^b
Delayed recall	10.6 ± 4.0	12.4 ± 3.3	0.011^a	10.1 ± 3.1	10.7 ± 3.3	0.24 ^b
Recognition	12.0 ± 3.3	13.6 ± 1.6	0.015^a	11.9 ± 3.1	13.1 ± 2.3	0.06 ^b
Learning ability	54.4 ± 11.6	59.7 ± 9.3	0.002^a	51.6 ± 9.6	56.1 ± 9	0.006^b
Fifth learning trial	12.8 ± 2.1	13.6 ± 1.9	0.041 ^a	12.0 ± 1.7	13.1 ± 1.5	0.011 ^b

Significant changes are indicated by bolding the number. Data are given as mean ± SD (raw scores). Memory "retention" was defined as the number of correct words recalled after the fifth trial (maximum 15 words) subtracted from those correctly recalled after the 30 min delay (maximum 15 words) multiplied by 1 to create positive relations. "Delayed recall" was defined as the number of correctly recalled words after the 30 min delay (maximum 15 words) and "recognition" was defined as the number of correctly recognized words minus false positives out of a subsequent list of 45 words read out loudly that comprised 15 correct and 30 new words (maximum = 15). "Learning ability" was defined as the sum of correctly recalled words during the five immediate learning trials (maximum score = 75 words). Raw scores were standardized into *Z*-scores by subtracting the group's mean from the individual score, followed by division by the group's SD.

^aWilcoxon signed-rank test.

^bPaired *t* test.

Figura 24: *Performance* mnemonica all'AVLT dopo 26 settimane di supplementazione di resveratrolo e quercetina o di placebo. In grassetto i valori *p* indicanti differenze statisticamente significative (Witte et al., 2014b).

knockout per *Klotho* si osserva un invecchiamento accelerato, mentre se sovra-espresso, il gene conduce all'estensione dell'aspettativa di vita dell'animale (Hayashi et al., 2007, 2016). Il gene *Klotho* codifica per la *Klotho related protein* (KLRP), anche nota come *human Cytosolic Neutral β -Glycosylceramidase*.

Uno studio (Wei et al., 2017) ha dimostrato l'effettiva interazione tra il complesso della proteina KLRP e le antocianine dell'*Aronia* attraverso tecniche di *docking* computazionale, per poi approfondire gli effetti di queste sulla funzione, struttura e biochimica dell'encefalo animale. Sono state utilizzate le antocianine più concentrate nei frutti di *Aronia*, cioè cianidina-3-araboside (4,7 mg/g), cianidina-3-galattoside (4,7 mg/g), cianidina-3-xiloside (0,47 mg/g) e cianidina-3-glucoside (0,1 mg/g). Lo studio è stato condotto su 60 topi adulti maschi, invecchiati per esposizione al D-galattosio, per 6-8 settimane. I topi sono stati divisi in un controllo negativo, un controllo positivo e due gruppi trattati con diversa dose di cianidina (15 e 30 mg/kg).

I modelli computazionali, visibili anche in Figura 25, hanno mostrato un probabile legame delle antocianine presso una regione della proteina KLRP collocata tra i domini α e β . Questo legame ha un effetto stabilizzante sull'appendice di KLRP ed impedisce la precipitazione della proteina a formare depositi fibrillari (Hayashi et al., 2007). L'analisi del modello animale ha mostrato una riduzione nel tasso di atrofia dell'encefalo ed un miglioramento di *performance* cognitiva, in termini di memoria e capacità di coordinazione, nei topi trattati, con andamento dose-dipendente. Si è osservato un aumento nell'espressione di enzimi antiossidanti, come glutatione perossidasi e superossido dismutasi, presso ippocampo e corteccia prefrontale ed un generale effetto antinfiammatorio, con ridotta espressione dei geni di COX-2, IL-1 e TNF- α (vedasi Figure 26). Si è notata una riduzione nei livelli di danno genomico e una minore attività delle vie di riparazione del DNA, i cui marcatori sono le proteine ATM/ATR e le chinasi Chk1/Chk2. L'integrità del genoma si collega a ridotta concentrazione di p53 e livelli sensibilmente più elevati delle tirosin-fosfatasi CDC2 e CDC25, che controllano la prosecuzione del ciclo cellulare.

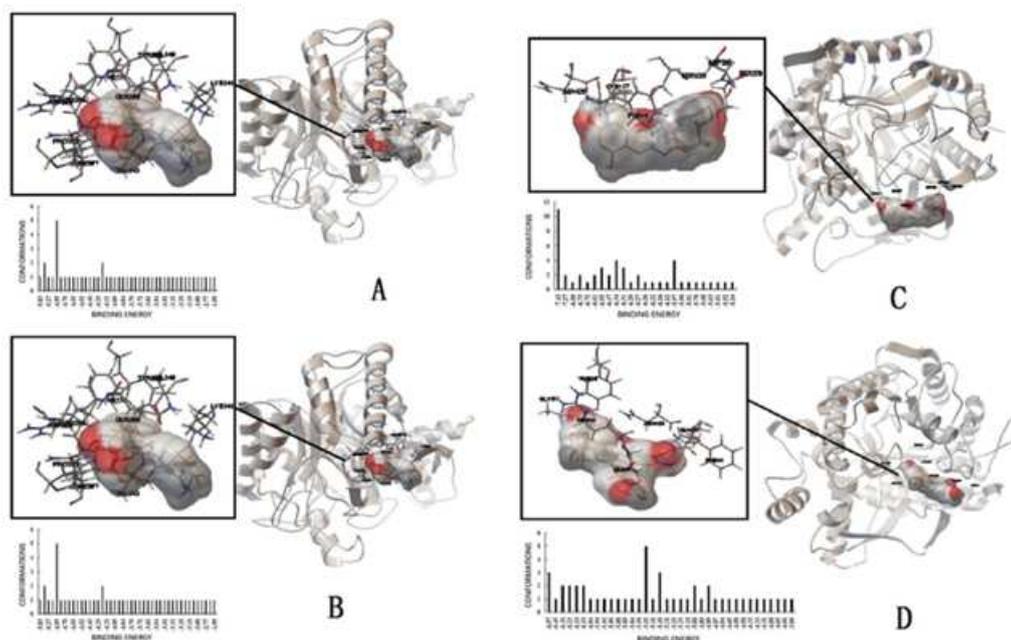


Figura 25: Modelli computazionali di *docking* dei più rappresentati composti antocianici dell'*Aronia melanocarpa*, nell'ordine A: cianidina-3-arabinoside, B: cianidina-3-galattoside, C: cianidina-3-glucoside e D: cianidina-3-xiloside e relativa energia di legame. Figure ottenute attraverso l'applicativo Authdock (Wei et al., 2017).

2.5 SPERMIDINA

La spermidina, anche nota come monoamminopropilputresceina, è un prodotto di degradazione della S-adenosilmetionina. Chimicamente, è una poliammina biogena, si veda Figura 27. Si tratta di un componente naturalmente presente in diversi alimenti, spesso impiegata ad elevate dosi in integratori alimentari. Uno studio ha confermato che un alto consumo di spermidina in soggetti umani sani ed in tarda età è sicuro per la salute (Schwarz et al., 2018). La spermidina può essere usata in prodotti per la salute del SNC, poiché è in grado di attraversare la BEE e si concentra in modo apprezzabile nell'encefalo.

La spermidina agisce come promotore naturale del processo di autofagia, il suo impiego estende la durata media della vita in diverse specie animali (Eisenberg et al., 2009, 2016; Morselli et al., 2011; Wang et al., 2012). Questa ipotesi è rafforzata osservando che la 3-metil-adenina, un inibitore dell'autofagia, è in grado di antagonizzare gli effetti positivi della spermidina (De Risi et al., 2020). Altri meccanismi molecolari sono stati proposti per l'attività della spermidina, tra cui l'azione sui recettori NMDA per il glutammato (Guerra et al., 2016), ma anche la protezione della sostanza grigia ippocampale da alterazioni della struttura sinaptica. La funzionalità delle cellule ippocampali dipende dalla presenza di un amminoacido a struttura anomala, detto hypusina, che si colloca nella struttura primaria di un fondamentale regolatore dei processi di trascrizione, la proteina eIF5A (*eukaryotic translation Initiation Factor 5A*). La

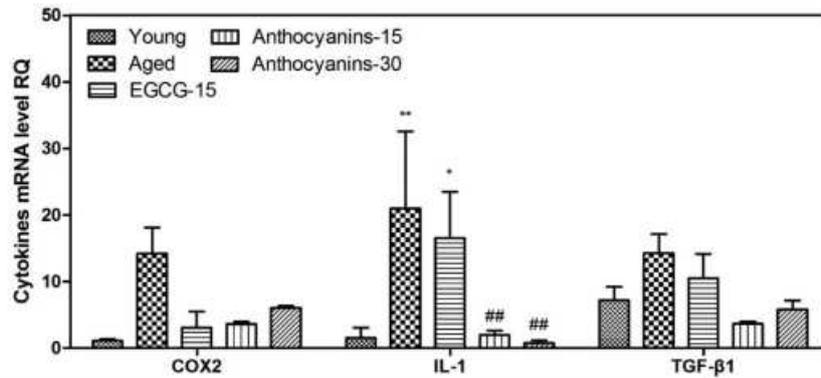


Figura 26: Differenze nell'espressione genica dei principali marcatori di infiammazione dopo trattamento di 6-8 settimane su topi, misurata come concentrazione dei rispettivi trascritti di mRNA estratti dal tessuto encefalico e quantificati con rt-PCR (Wei et al., 2017).

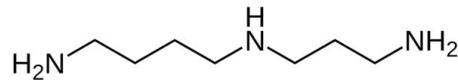


Figura 27: Struttura molecolare della spermidina (Alhadis).

produzione di hypusina, la cui struttura chimica è visibile in Figura 28, diparte da un'unità di spermidina ed una di lisina, attraverso il trasferimento della porzione 4-amminobutilica della spermidina al gruppo amminico in ϵ della lisina, si ottiene la deossi-hypusina, in seguito convertita in hypusina per aggiunta di un gruppo ossidrilico. La supplementazione dietetica di spermidina aumenta i livelli di hypusinazione dell'ippocampo, sostenendo la funzionalità di eIF5A. La proteina eIF5A è coinvolta anche nei processi autofagici, aumentando l'espressione del regolatore di autofagia TFEB (*Transcription Factor EB*) (Puleston et al., 2019; Zhang et al., 2019). La supplementazione dietetica di spermidina nelle mosche sembra ridurre la compromissione della memoria indotta dall'età e preservare la plasticità sinaptica (Gupta et al., 2013, 2016). Nei ratti, l'iniezione intraperitoneale od intracerebrale di spermidina potenzia le capacità di svolgere diverse *task* e migliora la memoria (Guerra et al., 2016).

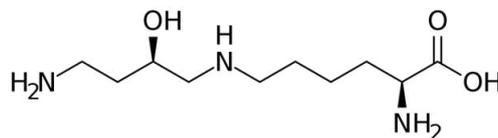


Figura 28: Struttura chimica dell'hypusina (Edgar).

Un recente studio (Schroeder et al., 2021) ha misurato la *performance* cognitiva di animali di 24 mesi esposti a supplementazione dietetica di spermidina per 6 mesi, ottenendo alcune promettenti evidenze,

relative al miglioramento nel comportamento esplorativo dei topi, definito dalla capacità di correlare uno stimolo luminoso alla disponibilità di acqua. L'applicazione del *Morris Water Maze test* o labirinto acquatico di Morris, un test per la memoria spaziale, che si basa sull'individuazione della posizione di una piattaforma di uscita non visibile, in una vasca piena d'acqua, ha evidenziato migliorate capacità di orientamento, ma solo in individui giovani e dietro ad un consumo di basse dosi di spermidina (vedasi Figura 29). La funzionalità della respirazione mitocondriale è apparsa migliorare sia su topi invecchiati, sia nella *Drosophila melanogaster*, anche se con risultati variabili in funzione del sesso e della durata di trattamento. La correlazione tra effetto della spermidina e processi di autofagia è dimostrata dalla scomparsa di qualsiasi efficacia in animali *knockout* per il gene ATG7 o dopo soppressione, con tecnica di *interfering-RNA*, della PINK1 o della proteina Park, ortologo murino della parkina.

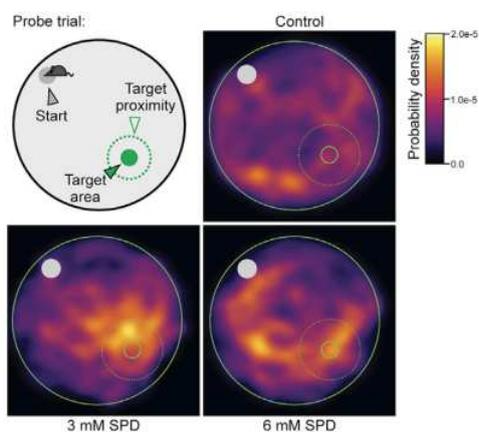


Figura 29: Risultati del *Morris Water Maze test* nel gruppo di controllo (in alto), nel gruppo trattato con spermidina a bassa dose (in basso a sinistra) e nel gruppo trattato con dose elevata (in basso a destra). Il colore giallo indica le aree dove il topo trascorre maggiormente il proprio tempo, da confrontarsi con lo schema in alto a sinistra, che definisce la posizione della piattaforma. I risultati migliorativi più evidenti si osservano nel gruppo trattato al più basso livello di dose (Schroeder et al., 2021).

Uno studio prospettico di coorte ha valutato l'apporto dietetico di spermidina di un gruppo di volontari, confrontandolo con la relativa capacità cognitiva, valutata come punteggio nel *Mini-Mental State Examination test*, che valuta le capacità cognitive complessive dell'individuo paragonandole ad una popolazione sana di riferimento. Si è osservato un effetto protettivo della spermidina introdotta con la dieta nello sviluppo di compromissioni cognitive. L'effetto protettivo osservato è di tipo dose-dipendente, con rischio di declino cognitivo molto ridotto alle alte dosi. Si tratta di uno studio che non ha valutato l'effetto della spermidina in forma di integratore alimentare, tuttavia si ritiene opportuno per completezza citarlo in questo paragrafo.

2.6 PROBIOTICI

L'uso di integratori alimentari contenenti probiotici per la prevenzione ed il trattamento dei fenomeni di *brain aging* si basa sull'interrompere la relazione deleteria tra cambiamenti spontanei del microbiota tipici della tarda età e conseguenze negative lungo l'asse cervello-intestino. Essenzialmente, gli integratori di probiotici devono favorire la ripopolazione dell'intestino dell'anziano con ceppi tipicamente giovanili. La disbiosi della tarda età è connessa al rallentamento della motilità intestinale e si articola in perdita di diversità di colonie, variazione delle specie dominanti, aumento della percentuale di anaerobi facoltativi e declino nel beneficio simbiotico per l'ospite (Salazar et al., 2017). I dati più forti riguardano il calo nella colonizzazione di *Bacteroides*, ma anche la diffusione di Firmicutes, tra cui i batteri dei generi *Clostridium*, *Enterococcus*, *Ruminococcus* e la crescita di colonie di *Escherichia coli*. I batteri del genere *Ruminococcus* arrivano a rappresentare anche il 9,6% del totale, risultando i più numerosi (Enck et al., 2009). L'uso di integratori probiotici consente di modificare la composizione del microbiota intestinale, favorendo la conservazione delle specie simbiote e diminuendo quella di organismi potenzialmente nocivi, attraverso un meccanismo di inibizione competitiva per i siti di legame con la mucosa, ma anche attraverso una vera e propria attività antibatterica, legata alla produzione di fattori antibiotici (Collado et al., 2007; Spinler et al., 2008). Il miglioramento della composizione del microbiota garantisce un'adeguata modulazione della funzionalità locale del sistema immunitario, con più efficace controllo da parte dell'ospite sulla colonizzazione di popolazioni non favorevoli (Hemarajata and Versalovic, 2013).

L'uso di integratori probiotici può modulare il microbiota intestinale in senso antinfiammatorio, favorire la completezza della barriera intestinale e la robustezza delle *tight junction* tra gli enterociti, ridurre la penetrazione di possibili antigeni pro-infiammatori (Zaylaa et al., 2018). Tutto ciò comporta una diminuzione dell'infiammazione latente di basso grado, con conseguenze anche sulla neuroinfiammazione. Studi svolti su modelli animali di invecchiamento indotto chimicamente, hanno evidenziato che la supplementazione dietetica di *Lactobacillus paracasei* OFS0291, *Lactobacillus helveticus* OFS1515 o *Lactobacillus fermentum* DR9 modula il sistema immunitario dell'ospite in senso antinfiammatorio, riducendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF- α , IFN- γ e IL-1 β . La supplementazione di *Lactobacillus plantarum* DR7 ha dimostrato di ridurre il rilascio di alcune di queste (in particolare INF- γ e TNF- α) e favorire il rilascio delle due principali citochine antinfiammatorie, IL-4 e IL-10. (Chong et al., 2019). Uno studio randomizzato ed in doppio cieco su 100 bambini affetti da sepsi severa ha dimostrato che la supplementazione di probiotici per una durata di 7 giorni riduce la produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL12p70, IL-17, TNF- α) ed aumenta quella di citochine antinfiammatorie (IL-10, TGF- β 1) anche su modello umano (Angurana et al., 2018), mentre una metanalisi di studi svolti su soggetti anziani o di mezza età ha mostrato una netta riduzione nei livelli di IL-6 e proteina C reattiva, un fondamentale *marker* ematologico di infiammazione, dopo supplementazione di probiotici (Custodero et al., 2018).

Diversi studi hanno evidenziato che l'uso di integratori probiotici può ridurre lo stress ossidativo. Ad esempio, uno studio svolto impiegando yogurt arricchito in *Lactobacillus acidophilus* ha mostrato, nel corso di 9 settimane, un calo nei biomarcatori di stress ossidativo (Mikelsaar and Zilmer, 2009). Un secondo studio, condotto con un integratore multispecie di probiotici su popolazione di diabetici di tipo II, ha mostrato un aumento della capacità antiossidante complessiva del plasma ed un aumento nei livelli di glutazione (Asemi et al., 2013), mentre su modello animale lo stress ossidativo indotto da una dieta ricca di grassi è stato ridotto supplementando *Lactobacillus plantarum* P-8 (Bao et al., 2012). I possibili meccanismi d'azione comprendono: la chelazione di ioni metallici liberi, che impedisce la catalisi della reazione di Fenton, l'aumento nell'attività della superossido dismutasi, il rilascio di metaboliti antinfiammatori, tra cui folati e glutazione, l'attivazione di vie di *signaling* anti-ossidanti e la riduzione nella popolazione intestinale di batteri patobionti, che possono contribuire all'aumento dello stress ossidativo (Wang et al, 2017; Landis and Tower, 2005).

Un integratore di probiotici, eventualmente arricchiti in componente prebiotica utile alla loro crescita, usato in adeguata quantità per equilibrare la relazione microbiota-cervello è definito come *psicobiotico* (Dinan et al., 2013). Potenziali integratori *psicobiotici* sono stati studiati per diverse indicazioni terapeutiche. Uno studio condotto usando latte fermentato colonizzato con *Lactobacillus helveticus* ha dimostrato, in soggetti di età compresa tra 60 e 75 anni, un miglioramento quantificabile delle funzioni mnemoniche e dell'attenzione (Chung et al., 2014). Un secondo studio condotto con 3 diversi ceppi batterici (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*), ha mostrato un miglioramento cognitivo estremamente significativo in una popolazione umana tra 60 e 95 anni di età.

Il *Lactiplantibacillus plantarum* OLL2712, o più semplicemente *Lactibacillus plantarum* è un batterio lattico, la cui azione nel microbiota è particolarmente improntata all'attività antinfiammatoria, attraverso il rilascio indotto di IL-10 a livello intestinale. L'IL-10 è la principale citochina antinfiammatoria, prodotta nel SNC dalle cellule della microglia, dagli astrociti e dagli oligodendrociti, con notevole capacità di prevenire od arginare i fenomeni neuroinfiammatori. Essa agisce da fattore anti-apoptotico e di sopravvivenza cellulare (Su et al., 2016). Il rilascio intestinale di IL-10 sembra avere ricadute positive anche sul SNC, riducendo l'importanza dei processi di *brain aging*. Utilizzando cellule di *Lactibacillus plantarum* inattivate termicamente, rispetto ai probiotici vivi, risulta essere massimo il rilascio intestinale di IL-10, grazie alla stimolazione delle cellule dendritiche e dei macrofagi intestinali residenti.

Un piccolo studio randomizzato ed in doppio-cieco, svolto su individui di età superiore a 65 anni (Sakurai et al., 2022) ha valutato la variazione delle capacità cognitive e mnemoniche, dopo somministrazione di un integratore di *Lactiplantibacillus plantarum* per 12 settimane. Le capacità mnemoniche sono state stimate valutando la componente verbale, quella visiva e fornendo una misurazione complessiva, considerando anche l'effetto delle abitudini dietetiche e la composizione del microbiota degli individui coinvolti nello studio. Si è osservato un chiaro aumento della capacità mnemonica dopo somministrazione del pro-

Domain	Start-Up		Follow-Up		Δ		p-Value
	Active	Placebo	Active	Placebo	Active	Placebo	
Visual memory	41.7 ± 5.9	43.3 ± 4.1	42.7 ± 5.0	41.6 ± 4.6	1.1 ± 6.1	-1.6 ± 5.5	0.044 *
Verbal memory	49.6 ± 6.2	49.5 ± 5.1	49.4 ± 6.1	48.1 ± 5.7	-0.2 ± 5.2	-1.4 ± 6.3	0.359
Composite memory	91.3 ± 9.7	92.8 ± 8.0	92.2 ± 9.3	89.7 ± 8.1	0.8 ± 8.3	-3.1 ± 9.6	0.058

Values represent the mean ± standard deviation. Δ: amount of change from baseline. The p-value was determined by two-way time × group analysis of score change. * p < 0.05.

Figura 30: Valutazione della memoria visiva, verbale e complessiva con metodo *Cognitrix* dopo supplementazione di 12 settimane di *Lactiplantibacillus plantarum* o placebo, i valori p significativi sono evidenziati con * (Sakurai et al., 2022).

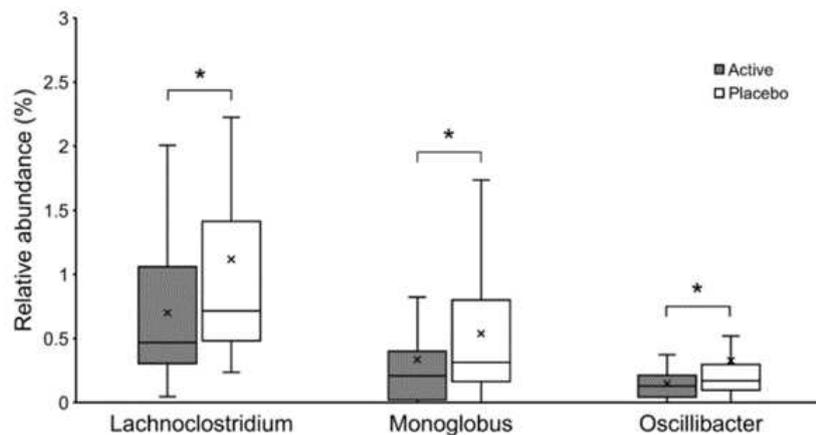


Figura 31: Abbondanza relativa dei batteri dei generi *Lachnoclostridium*, *Oscillibacter* e *Monoglobus* in campioni fecali dopo trattamento di 12 settimane con *Lactiplantibacillus plantarum* o con placebo. Si apprezza un significativo calo nelle popolazioni di tutti e tre i generi di batteri patobionti (Sakurai et al., 2022).

biotico, anche se questo sembra legato alla sola componente visiva, senza alcun effetto apprezzabile sulla memoria verbale (si vedano i risultati riportati in Figura 31). Si tratta di un risultato importante, visto che studi precedenti suggeriscono che basse performance nella memoria visiva, molto più che in quella verbale, definiscono stadi di *mild cognitive impairment* a rapida progressione in malattia di Alzheimer vera e propria (Seo et al., 2018).

Nei soggetti trattati con il probiotico si è osservato un calo nei generi *Lachnoclostridium* e *Oscillibacter*, il cui aumento è descritto quando sussiste una condizione di infiammazione basale, ad esempio nell'obesità indotta da una dieta ricca in grassi (Jo et al., 2021). Gli *Oscillibacter* sono patogeni umani opportunisti e la loro presenza comporta un aumento anomalo della permeabilità intestinale (Chen et al., 2019). Infine, la crescita del genere *Monoglobus*, anch'essa ostacolata nel gruppo di *testing*, sembra causare un aumento dei livelli ematici di ammoniaca, con effetto deleterio sulla barriera intestinale (Chen et al., 2022). Si veda il grafico in Figura 31.

3 CIBI FUNZIONALI

I cibi funzionali, più noti con il termine inglese di *functional foods*, sono alimenti che, per il loro complessivo apporto di nutrienti, oltre a fornire sostanze utili al regolare sostentamento dell'organismo, producono degli effetti positivi particolari a carico di alcune sue funzioni fisiologiche. Il cibo funzionale è considerato un prodotto da assumere *in toto*, non scindibile nei suoi costituenti molecolari, dunque l'efficacia di potenziali cibi funzionali deve essere testata su soggetti umani o al massimo su animali, ma non *in vitro*. Per molti degli alimenti che saranno trattati nelle prossime pagine sono disponibili svariati studi di efficacia, svolti sia su modello animale di invecchiamento o neurodegenerazione, sia su soggetti umani di differente età. I risultati di questi sono spesso contrastanti per diverse ragioni, tra cui la poca standardizzazione di questi alimenti, soprattutto quando si tratta di derivati vegetali. Essi contengono centinaia di sostanze chimiche particolari, per le quali è possibile ipotizzare una qualche attività biologica e le loro concentrazioni relative variano moltissimo sulla base di una serie di fattori, tra cui le condizioni di coltivazione e di raccolta, ma anche i tipi di trattamento applicati alle materie prime. Ne risulta che studi differenti, che impiegano gli stessi alimenti funzionali non siano pienamente confrontabili, poiché le quantità di principi attivi e le loro disponibilità possono essere completamente diverse.

3.1 COMPONENTI COMUNI A DIVERSI CIBI FUNZIONALI

Un ruolo nella prevenzione dei fenomeni di invecchiamento è stato individuato per alcuni fosfolipidi e per la classe degli acidi grassi polinsaturi. Il sistema nervoso centrale contiene una notevole componente lipidica, che comprende in particolar modo i fosfolipidi; concentrazioni importanti si osservano principalmente per la fosfatidiletanolamina (54 nmol/mg) e per la fosfatidilcolina (31 nmol/mg), mentre secondariamente si trovano la fosfatidilserina (8 nmol/mg) ed il fosfatidilinositolo (5 nmol/mg) (dati tratti da Choi et al., 2018). Il ruolo dei fosfolipidi nel SNC è principalmente strutturale, essendo componenti chiave delle membrane neuronali e di quelle di organelli importanti, come mitocondri, reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi, perossisomi e lisosomi. Il consumo alimentare di fosfolipidi migliora la funzione cognitiva e la memoria, come si osserva in studi condotti su modello animale (Liu et al., 2014). Un ruolo molto significativo nella biochimica cellulare è svolto dalla fosfatidilserina che, essendo acida e ionizzabile, contribuisce alla regolazione del bilancio ionico di membrana e quindi alla modulazione locale del potenziale elettrico; inoltre residui di fosfatidilserina sono richiesti per la regolare funzionalità del *signaling* cellulare, mantenendo il livello di attività basale della PKC (*Protein Kinase C*). Nell'invecchiamento, il calo di attività della PKC a livello neuronale conduce al declino delle capacità cognitive dell'individuo (Crook et al., 1991). È possibile citare diversi studi che hanno analizzato l'impatto sulle capacità cognitive di un maggiore consumo dietetico di fosfatidilserina, due di questi sono stati svolti su anziani con compromissione cognitiva, impiegando 300 mg/giorno di fosfatidilserina estratta dalla soia e

hanno osservato un miglioramento cognitivo visibile in 6 mesi di *follow-up* (Cenacchi et al., 1993; Olsen et al., 1999). Fonti alimentari di fosfatidilserina sono le frattaglie, il tuorlo d'uovo e la soia. Il livello di fosfatidilcolina mostra una riduzione indotta dall'età, in particolare presso le aree corticali ed ippocampali (Söderberg et al., 1990). Per assumere fosfatidilcolina è necessario consumare frutta secca, spinaci, frattaglie animali, ma la sorgente più comune di questo fosfolipide è il tuorlo d'uovo, che lo contiene sotto forma di lecitina, insieme alla fosfatidiletanolamina.

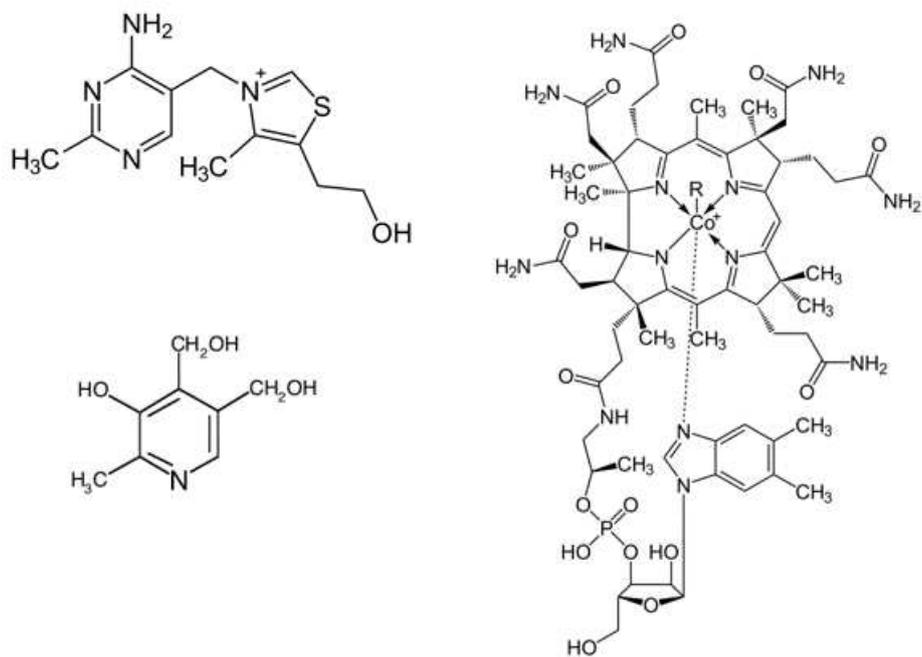
Un'altra classe di nutrienti lipidici importanti per la salute del cervello è costituita dagli acidi grassi omega-3 a lunga catena, tra cui i già citati acido docosaesaenoico ed acido eicosapentaenoico. A livello alimentare, per introdurre una sufficiente quantità di omega-3 è sufficiente un consumo soddisfacente di pesce (Naureen et al., 2022), in particolare quello che vive in mari freddi allo stato brado, ma anche il salmone, lo sgombrò, il tonno e la palamita, le aringhe, il merluzzo, il pesce spada, le sardine, la trota, la carpa, il cefalo e tutto il pesce azzurro. Una certa disponibilità di omega-3 è garantita anche consumando molluschi e crostacei. L'acido docosaesaenoico sembra essere particolarmente importante per lo sviluppo encefalico e dell'apparato visivo, risultando concentrato presso la retina e la corteccia visiva (Uauy et al., 2006). Per questo, un adeguato consumo dietetico di DHA è fondamentale fin dalla nascita. Nei bambini allattati naturalmente, il DHA fornito attraverso il latte materno è sufficiente alle richieste fisiologiche, mentre se si impiegano formule latte sintetiche, il suo contenuto deve essere considerato nella scelta dell'alimento più idoneo. I livelli encefalici di DHA sembrano calare anche nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer, confermando la sua importanza per memoria e funzioni cognitive, questo fenomeno potrebbe essere dovuto alla progressiva compromissione dei sistemi enzimatici delle desaturasi e alla perossidazione lipidica, ma anche ad una dieta ricca di omega-6 non opportunamente compensati con il consumo di omega-3 (Morris, 2006; Söderberg et al., 1991). Gli effetti positivi degli alimenti ricchi di omega-3 si osservano in una serie di studi che hanno dimostrato come il consumo dietetico di pesce, fonte primaria di questo nutrimento, si associ ad un rischio minore di declino cognitivo e sviluppo di patologie neurodegenerative. Uno di questi ha misurato i livelli di acidi grassi di ciascuna categoria presso la membrana eritrocitaria, confrontandoli con le funzionalità encefaliche, rivelando un effetto protettivo verso la degenerazione per gli omega-3 ed un maggiore rischio per gli omega-6 e per l'acido stearico (Heude et al., 2003). Un alimento di origine vegetale particolarmente ricco di omega-3 è il frutto del noce, che contiene una considerevole quantità di acido α -linolenico, cui sono imputati alcuni effetti positivi sulle capacità cognitive, osservati sui ratti (Willis et al., 2009). Gli acidi grassi omega-3 sono nutrienti instabili, a causa della facile ossidabilità, si pensa che l'associazione di alimenti che contengono nutrienti ad azione anti-ossidante possa aumentare la loro efficacia protettiva. Tra gli antiossidanti di origine alimentare, deve essere menzionata l'astaxantina (vedasi Figura 32), un carotenoide non pro-vitamina A, prodotto dall'alga *Haematococcus pluvialis* e contenuto in salmone, gamberi ed altri crostacei, noto per essere uno dei più potenti antiossidanti naturali, grazie al suo ruolo di *scavenger* delle specie radicaliche (Galasso et

fenomeni di accelerato invecchiamento dell'encefalo, mentre le sue sorgenti alimentari sono il pesce (tonno e salmone), la carne e alcuni frutti (banana, arancia, papaya) (Zempleni et al., 2013). La vitamina B12 è il cofattore della metionina sintetasi e della metilmalonil-CoA mutasi, due enzimi coinvolti nel metabolismo di acidi grassi, acidi nucleici, amminoacidi, ma anche nella produzione di neurotrasmettitori e nella sintesi della guaina mielinica. La carenza di vitamina B12 comporta una compromissione cognitiva e una produzione anomala di neurotrasmettitori. Le fonti alimentari di questo composto sono i latticini, le uova e la carne, con una carenza comune soprattutto negli individui vegani (Kumar, 2014). Le vitamine del gruppo B sono importanti per il metabolismo dell'omocisteina, attivamente degradata dalla cistationina- β -sintetasi, dipendente dalla vitamina B6 e dalla metionina sintetasi, tra gli enzimi B12-dipendenti. Alti livelli di omocisteina rappresentano un importante fattore di rischio cardiovascolare e cerebrovascolare, recentemente si è osservato anche un aumento nel rischio di demenza e *deficit* cognitivi (Smith et al., 2016). Il rischio di iper-omocisteinemia risulta apprezzabile soprattutto in individui di età uguale o superiore a 60 anni, forse a causa delle carenze di vitamina B12 che sono comuni in questa fascia di popolazione (Garcia and Zanibbi, 2004), mentre l'introduzione di vitamine del gruppo B riduce l'omocisteinemia e preserva la salute del SNC.

Alcune evidenze sembrano correlare i fenomeni degenerativi del SNC con il consumo dietetico di vitamine liposolubili, in particolare vitamina E e vitamina D. Le sorgenti dietetiche di vitamina E sono: noccioline, semi, avocado, mango, kiwi, salmone atlantico e trota. Vi sono evidenze di un ruolo neuroprotettivo per l' α -tocoferolo, che riduce una serie di processi di danno tipici dell'invecchiamento, tra cui perossidazione lipidica, danno genetico, alterazioni del metabolismo mitocondriale, morte cellulare e deposizione di amiloide A β (Morris et al., 2005; Wengren et al., 2007). Il γ -tocoferolo sembra diminuire i segni tipici della malattia di Alzheimer, come la deposizione di amiloide e di proteina tau iper-fosforilata. Tuttavia, elevati livelli endogeni di α -tocoferolo accompagnati da una ridotta disponibilità di γ -tocoferolo favoriscono la comparsa dei segni tissutali della malattia di Alzheimer e lo stesso vale nella supplementazione del solo α -tocoferolo, che deprime i livelli di γ -tocoferolo. Invece, impiegando alimenti che apportano entrambe le forme di vitamina E sembra possibile ritardare la compromissione cognitiva e l'insorgenza della patologia (Morris et al., 2015). La vitamina D proviene sia da fonti alimentari, come pesce dei mari freddi, frutti di mare, grasso di pesce, sia dalla biosintesi dietro stimolazione da parte della luce solare. Una scarsa disponibilità di questo nutriente sembra aumentare il rischio di neurodegenerazione, in forma di malattia di Alzheimer o di Parkinson, mentre la sua introduzione dietetica protegge da queste patologie (Caccamo et al., 2018; Evatt et al., 2008; Littlejohns et al., 2014).

3.1.3 Antiossidanti

Frutta ed ortaggi freschi sono fonti principali di metaboliti ad azione anti-ossidante, tra cui quelli appartenenti alla famiglia dei polifenoli. Per una descrizione formale delle caratteristiche chimiche dei composti



[ht]

Figura 33: A sinistra in alto: struttura chimica della tiamina, o vitamina B1 (Neurotiker). A sinistra in basso: struttura chimica della piridossina, una delle forme chimiche della vitamina B6 (Oks). A destra: struttura chimica della cobalamina, una delle forme chimiche della vitamina B12 (Neurotiker).

di questa famiglia si rimanda al precedente capitolo di questo elaborato. Tra gli alimenti comuni, cipolle, broccoli, pomodori, cavolo, sedano, uva e mele contengono flavanoli; prezzemolo, sedano, peperoncino e timo sono fonti di flavoni; pompelmo, arancia, limone e relativa buccia, agrumi in generale apportano flavanoni; soia e tofu contengono isoflavoni; fragole, lamponi, mirtilli, sambuco, ribes nero, bacche, melograno e vino rosso sono fonti di antocianine. Come già anticipato, i polifenoli hanno proprietà fisiologiche comuni: sono anti-ossidanti, antinfiammatori e potenziali senolitici, possono modulare il microbioma intestinale in senso migliorativo, promuovere la stabilità e l'aggregazione di complessi proteici, mantenere elevati livelli di glutazione in forma ridotta ed attivare vie di biosegnalazione neurotrofiche (Hemanth et al., 2016).

Il consumo di estratti ricchi di polifenoli, tra cui quelli di lampone e mirtillo sembra potenziare le funzioni mnemoniche agendo sulla biosegnalazione ippocampale (Ayaz et al., 2019). Sono descritte una serie di attività che contrastano l'insorgenza della malattia di Alzheimer, tra cui una migliore degradazione del monomero $A\beta_{42}$, il blocco dell'oligomerizzazione di $A\beta$, la modulazione dell'interazione tra i monomeri ed il rimodellamento degli oligomeri in forme non tossiche, ma anche la modulazione del livello di fosforilazione di tau e la prevenzione della formazione di strutture a β -foglietto nella conformazione di tau (Zheng et al., 2019). Alcuni polifenoli hanno un'azione migliorativa sulla funzionalità del sistema cerebrovascolare, come accade per quelli estratti dal tè verde, dal caffè, dal cacao, dal succo di melograno, dagli estratti di uva e dal vino rosso, dalla soia. Un ultimo meccanismo d'azione descritto è l'attività antinfiammatoria dovuta all'inibizione della via di NF- κ B, i polifenoli che esplicano questo effetto in modo più spiccato sono: resveratrolo (vino rosso e uva), isotiocianati (crucifere o brassicacee, come cavolo, cavolfiore, rapa, senape, ravanella, rucola e rafano), curcumina (radice di curcuma), idrossitirosole (olio vergine d'oliva), kahweol (caffè), partenolide (*Tanacetum parthenium*), procianidine e catechine del cacao (Càrdenas et al., 2011; Jeong et al., 2004; Marika et al., 2019).

3.2 CIBI FUNZIONALI DI ORIGINE VEGETALE

Saranno ora analizzati gli effetti di alcuni alimenti di origine vegetale, mettendone in risalto i possibili meccanismi d'azione molecolari e riportando l'esito di alcuni studi di efficacia disponibili in letteratura, relativi in particolare alla prevenzione del *brain aging* e della neurodegenerazione.

3.2.1 Vino rosso ed uva

Il vino deriva da un processo di fermentazione del succo d'uva, estratto dalla pianta della *Vitis vinifera*, in cui si verifica la fermentazione alcolica degli zuccheri, in particolare quelli esosi, che vengono convertiti in etanolo. Il vino contiene oltre 500 composti diversi, principalmente acqua, etanolo, acidi carbossilici, zuccheri e glicerolo, secondariamente pectine e polisaccaridi in bassa concentrazione. Vi si trovano anche una serie di polifenoli di grande interesse, tra cui flavoni (quercetina), flavanoli e flavan-dioli (catechine,

epicatechine e leucoantocianine), antocianine e tannini. Sono presenti sostanze a basso peso molecolare, tra cui acidi fenolici e stilbeni, in particolare il resveratrolo, sia in conformazione *trans*-, che in conformazione *cis*-, in forme solubili ad elevata biodisponibilità. Il vino, come tale, ha una serie di effetti biologici utili, tra cui un'azione antiossidante, che comprende l'effetto *scavenger* dei superossidi, la riduzione nell'ossidazione delle lipoproteine e nella perossidazione lipidica, un'attività antiaggregante piastrinica e antinfiammatoria, grazie all'azione sopprimente la via degli eicosanoidi ed un effetto vasodilatatore, legato al rilascio maggiorato di ossido nitrico. Molti degli effetti benefici descritti per l'uva ed il vino derivano dall'azione del suo principale metabolita, il resveratrolo, che si ritrova in minor percentuale anche in noccioline, pistacchi e mirtilli (Howes and Perry, 2011). Oltre ad avere proprietà antinfiammatorie ed anti-ossidanti, già citate nel precedente capitolo, il resveratrolo è il più potente inibitore noto dell'oligomerizzazione di A β 42 tra i derivati vegetali e riduce l'espressione di transtiretina, anch'essa coinvolta nella tossicità delle proteine amiloidogeniche (Costa et al., 2017; Williams et al., 2011). Diversi studi concordano nell'individuare un effetto positivo, in grado di prevenire il declino cognitivo e l'insorgenza di forme di demenza, per i bevitori moderati o blandi, mentre per i forti consumatori di alcolici l'effetto risulta peggiorativo. Gli effetti neuroprotettivi del vino sembrano essere legati, almeno in parte, ad un miglioramento della salute cardiovascolare e cerebrovascolare, legato sia all'azione propria dell'alcol, sia all'effetto di alcuni componenti della bevanda, tra cui i polifenoli, la vitamina C ed E (Kawas, 2006).

L'uva contiene altre sostanze di interessante attività biologica, ad esempio il picetannolo (3',4',3,5-tetraidrossistilbene, vedasi Figura 34). La sua concentrazione è sensibilmente inferiore a quella del resveratrolo, ma esso mostra un forte effetto *scavenger* dei radicali liberi (Williams et al., 2011). Altri principi attivi comprendono catechine, flavoni ed acidi fenolici, tra cui l'acido ferulico, l'acido gallico e l'acido caffeico, che contribuiscono agli effetti antinfiammatorio ed anti-ossidante del succo d'uva. Il succo d'uva ha mostrato, dopo un consumo continuativo di 12 settimane, un effetto migliorativo nell'apprendimento verbale in soggetti anziani, mentre non si è verificato alcun miglioramento su forme diagnosticate di demenza (Philips, 2017). Viceversa, un secondo studio svolto su individui con parziale declino cognitivo ha dimostrato un effetto protettivo contro le alterazioni metaboliche che colpiscono alcune aree del cervello nelle fasi precoci della malattia di Alzheimer (Lee et al., 2017). Tra le varie tipologie di uva, la *Vitis lambrusca*, anche nota come uva Concord, ha dato promettenti risultati negli studi su modello animale. Un successivo studio ha mostrato un miglioramento delle funzioni cognitive in anziani affetti da declino cognitivo, ma non da forme di demenza (Krikorian et al. 2008). Non è chiaro se questi effetti siano da attribuire alle antocianine od alle proantocianidine presenti nel succo di questo particolare tipo d'uva.

3.2.2 Fragole

Studi svolti su modello animale hanno evidenziato che un elevato consumo dietetico di fregole (*Fragaria ananassa*) potrebbe migliorare diversi parametri legati ai processi di invecchiamento dell'encefalo, alla

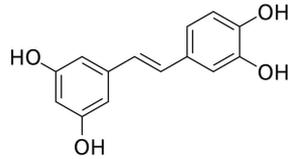


Figura 34: Struttura chimica del picetannolo (Innerstream).

compromissione delle funzioni cognitive ed ai *deficit* motori (Joseph et al., 1999; Shukitt-Hale et al., 2015). Nella fattispecie, dopo somministrazione con la dieta di fragole per un periodo di 2 mesi, si sono osservate *performance* superiori in un test di equilibrio generale e coordinazione, miglioramento nella memoria procedurale, aumentata neurogenesi presso il giro dentato dell'ippocampo e maggiori concentrazioni locali di IGF-1. L'effetto antinfiammatorio dei componenti polifenolici delle fragole è stato evidenziato in uno studio umano che ha osservato una riduzione nei livelli di proteina C reattiva, IL-1 β e TNF- α , in persone sovrappeso di ambo i sessi, dopo 6 settimane di supplementazione dietetica, suggerendo una riduzione dell'infiammazione basale tipica della sindrome metabolica. In un recente studio umano (Miller et al., 2021), la supplementazione dietetica di fragole ha mostrato effetti migliorativi soprattutto sulle funzioni mnemoniche, controllate nell'area dell'ippocampo, portando a supporre che i polifenoli contenuti nelle fragole esplicino la propria attività in particolare a livello delle aree ippocampali, come ipotizzato anche in altri studi disponibili in letteratura (Shukitt-Hale et al., 2007). Questa ipotesi permette di differenziare l'attività neuroprotettiva delle fragole da quella di alcune bacche, come i mirtilli, per cui un precedente studio ad opera degli stessi autori aveva evidenziato un effetto protettivo a livello del nucleo striato e della corteccia frontale, ove vengono controllate le attività esecutive dell'encefalo (Miller et al., 2018).

3.2.3 Acero viola

L'olio di semi di *Acer truncatum* proviene da una pianta originaria dell'area settentrionale della Cina, nota come acero viola. Si tratta di una pianta per la quale sono stati ipotizzati degli effetti sull'invecchiamento dell'encefalo, a prevenire il declino cognitivo. In particolare, l'olio contiene una serie di sostanze interessanti:

- Acidi grassi monoinsaturi: acido palmitoleico, acido oleico, acido 11-eicosaenoico, acido erucico, acido nervonico.
- Acidi grassi polinsaturi: acido α -linolenico e acido γ -linolenico, EPA e DHA, acido linoleico, acido arachidonico e acido 13,16-docosadienoico.
- Acidi grassi saturi: acido palmitico, acido stearico, acido tetradecanoico, acido eptadecanoico, acido arachidico, acido beenico, *wood tar acid*.

- Altri composti: β -carotene, vitamina E e ferro.

L'olio di semi di acero viola è una delle maggiori fonti vegetali di acidi grassi omega-3, di cui sono già stati evidenziati i ruoli biologici. Contiene l'acido nervonico, che è il maggiore componente anche dell'olio di *Malania oleifera*, noto per migliorare apprendimento e memoria, soprattutto se assunto insieme ad un supplemento di DHA e vitamina E (Wu et al., 2020). Inoltre, non c'è alcuna prova di tossicità per l'olio di acero viola, che può essere agevolmente impiegato come cibo funzionale.

Uno studio recente (Li et al., 2021) ha evidenziato che alcune proteine coinvolte nei processi infiammatori, nella cascata coagulatoria ed in quella del complemento, nella risposta immunitaria innata, sono fortemente sovra-regolate nei topi invecchiati, mentre mostrano una concentrazione nettamente minore dopo consumo di olio di acero viola, raggiungendo valori simili a quelli osservati in individui giovani. Un altro effetto evidente è l'aumento nella secrezione encefalica di BDNF e l'*up-regulation* della relativa via di biosegnalazione. Il BDNF attiva il fattore TrkB (*Tropomyosin receptor kinase B*), che promuove l'auto-fosforilazione di un particolare residuo di tirosina, sito nella regione intracellulare; ne consegue l'attivazione di diverse cascate di messaggeri, tra cui il *pathway* di PI3K-AKT, quello della fosfolipasi C γ 1 (PLC γ 1-PKC), quello delle MAPK e quello di ERK. Questi effetti sono osservabili dall'aumento nella concentrazione ippocampale delle proteine fosforilate p-TrkB, p-ERK e p-AKT (vedasi Figura 35). L'espressione genica del BDNF è regolata dal fattore p-CREB, i cui livelli crescono dopo trattamento con olio di acero viola (Zhang et al., 2019b). In ultima, lo studio ha evidenziato una correlazione significativa tra somministrazione di olio di acero viola e riduzione dei principali biomarcatori neuro-infiammatori, come IL-1 β , IL-6 e TNF- α , viceversa non si sono osservati effetti né per IL-1 α , pro-infiammatoria, né per le citochine antinfiammatorie IL-4 e IL-13.

3.2.4 Agrumi e bacche

Le bacche e gli agrumi contengono una serie di composti polifenolici, tra cui flavonoidi, antocianine e antocianidine, tannini, acidi fenolici, cumarine e terpenoidi. Di seguito saranno analizzate le proprietà imputabili agli agrumi ed a cianidine ed antocianine, che provengono dal succo del mirtillo, della mora e della ciliegia.

LIMONE

I più importanti metaboliti polifenolici contenuti negli agrumi, tra cui limone, arancia, lime e pompelmo e nei relativi estratti, sono di seguito elencati, accompagnati da una breve descrizione delle loro probabili attività biologiche.

- Esperidina ed esperetina appartengono alla classe dei flavanoni, sembra possano ridurre diversi processi di danno tra cui: morte cellulare, eccitotossicità, stress ossidativo, infiammazione e disfunzione mitocondriale, come si osserva in studi *in vitro* su cellule (Hwang and Yen, 2008; Wang et al., 2013).

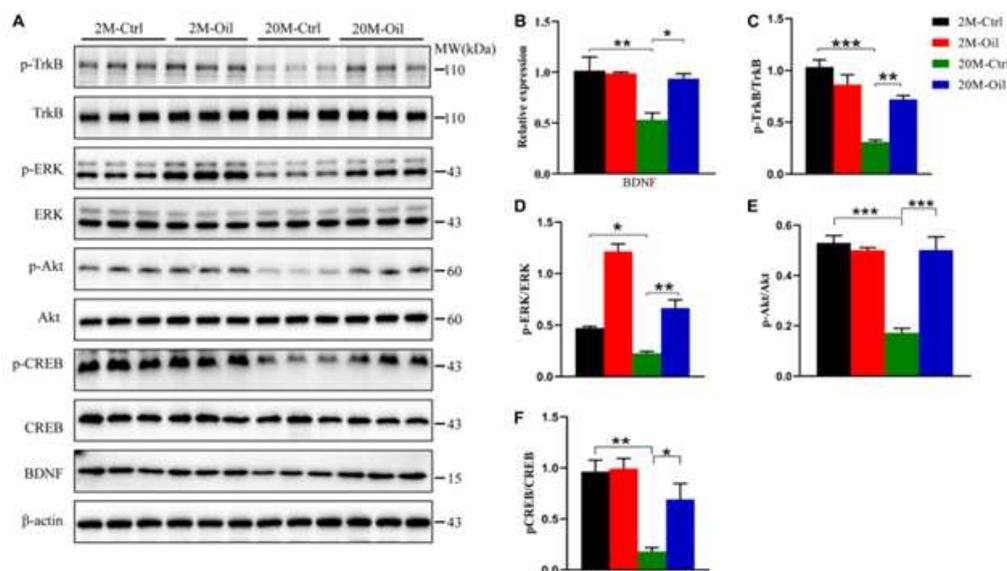


Figura 35: *Western blot analysis* di alcuni biomarcatori proteici in topi di due mesi di vita ed in topi di venti mesi di vita dopo trattamento con olio di semi di *Acer truncatum* o con placebo e relativa analisi statistica (Li et al., 2021).

- La naringenina, un flavanone, migliora lo stress ossidativo e la perossidazione lipidica, riduce l'infiammazione agendo su diverse citochine (IL-1, TNF- α , TNF- β), sulla via di NF- κ B e sull'attivazione della caspasi-3 (Sachdeva and Chopra, 2015).
- La nobiletina (5,6,7,8,3',4'-esametossiflavone) riduce lo stress ossidativo e l'iperfosforilazione della proteina tau presso il tessuto ippocampale (Nakajima et al., 2013, 2015), ne consegue una diminuzione del rischio di insorgenza della malattia di Alzheimer in diversi modelli animali, tra cui ratti sottoposti ad infusione di amiloide- β (Matsuzaki et al., 2006).
- Il 3,5,6,7,8,3',4'-eptametossiflavone promuove la produzione di BDNF ed attiva le vie di sopravvivenza cellulare (Sawamoto et al., 2019).
- La diosmina, un metossiflavone, riduce i livelli di TNF- α e mostra un'azione neuroprotettiva (Shabani and Mirshekar, 2018).
- L'auraptene o 7-geranilossicumarina inibisce l'attivazione della microglia ed agisce in senso antinfiammatorio riducendo l'attività della COX-2 (Okuyama et al., 2013).

Il limone è una fonte di nutrienti molto utili, contiene elevate concentrazioni di vitamina C, acido folico, fibre e pectine, minerali vari (Arias and Laca, 2005; Nagy, 1980); tuttavia, i metaboliti secondari più importanti nella prevenzione del *brain aging* appartengono alle classi dei flavonoidi e delle cumarine, con contributo anche di limonoidi e carotenoidi (Chhikara et al., 2018). Il genere *Citrus* L. comprende tre

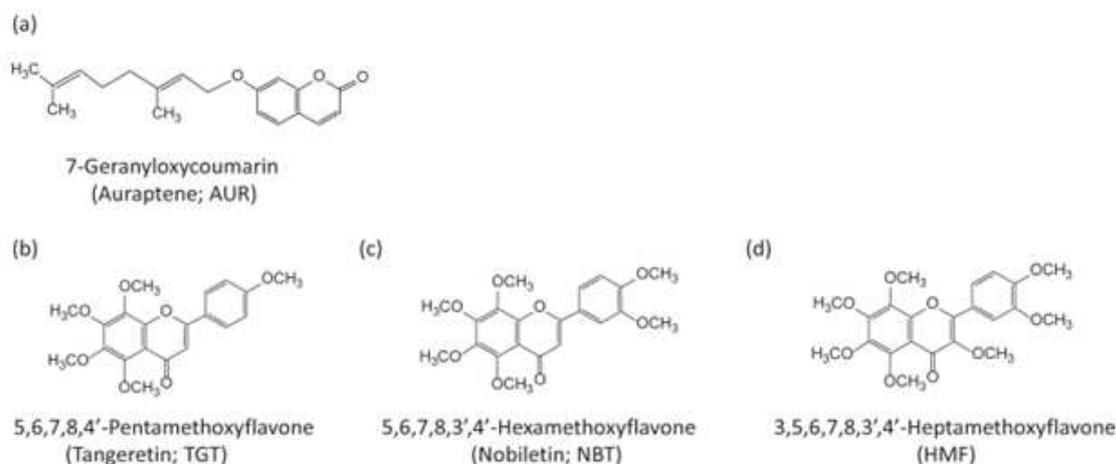


Figura 36: Struttura chimica dei principali metaboliti del *Citrus kawachiensis* (Furukawa et al., 2021).

principali specie di limone, divise in oltre 40 sottospecie, con diverso contenuto in metaboliti secondari; tra questi, il *Citrus kawachiensis* ha mostrato il profilo biochimico più interessante, poiché il suo estratto alcolico è in grado di fosforilare le chinasi ERK1 ed ERK2 (Furukawa et al., 2012a), il cui ruolo nei processi di invecchiamento, legato all'attivazione del fattore CREB, è stato già illustrato in precedenza. L'estratto alcolico di *Citrus kawachiensis* può essere ripartito in una componente solubile in acqua, una solubile in *n*-esano e una solubile in etil-acetato, constatando che ad essere responsabili dell'attivazione di CREB sono i metaboliti apolari, accumulati nella porzione solubilizzata in *n*-esano. I principali costituenti biochimici di questa fase sono: l'auraptene (AUR), il 5,6,7,8,4'-pentametossiflavone (TGT), la nobiletina (NBT) ed il 3,5,6,7,8,3',4'-eptametossiflavone (HMF) (vedasi Figura 36). Il 5,6,7,8,4'-pentametossiflavone (TGT) è un polimetossiflavone per cui è nota una funzione protettiva su modello animale di malattia di Parkinson, potendo ritardare la perdita di cellule tirosina idrolasi-positivo della *substantia nigra* mesencefalica e diminuire il contenuto di dopamina delle cellule dello striato (Datla et al., 2001).

Studi *in vitro* hanno evidenziato che HMF può favorire la crescita delle terminazioni neuritiche (Furukawa et al., 2012b). Su modello animale si sono osservati diversi effetti neuroprotettivi, ad esempio la capacità di impedire la morte neuronale nelle cellule ippocampali sottoposte a stress ischemico (Okuyama et al., 2014a), oppure l'attività antinfiammatoria, legata alla regolazione della funzionalità degli astrociti e della microglia, sia in topi colpiti da ischemia, sia in caso di neuroinfiammazione indotta tramite somministrazione di LPS (Okuyama et al., 2014a; 2015). Ulteriormente, HMF ha mostrato di indurre la sintesi di BDNF a livello astrocitario (Okuyama et al., 2014; 2012), attraverso l'attivazione della via PKA/ERK/CREB e la *down-regulation* di alcune fosfodiesterasi (Sawamoto et al., 2019); ne consegue un incremento dei processi di neurogenesi ed un accumulo di precursori neuronali nelle aree in cui tali processi possono svolgersi (Okuyama et al., 2012). Tutte queste evidenze sono sostenute da misure che

hanno certificato la biodisponibilità orale di HMF, che risulta immediatamente presente nel tessuto del SNC dopo consumo attraverso la dieta (Sawamoto et al., 2017). Spostando l'attenzione su AUR, anche questo composto sembra indurre la proliferazione assonica *in vitro* (Fukurawa et al., 2017). In vivo, su modello animale, AUR riduce la morte cellulare nell'ippocampo, dopo danno ischemico o dopo induzione di neuroinfiammazione da LPS (Okuyama et al., 2013; 2016). L'attività antinfiammatoria di AUR è molto spiccata, con chiara riduzione nell'iper-attività microgliale ed astrocitaria, cui consegue *down-regulation* della COX-2 centrale (Okuyama et al., 2013; 2014b; 2015). Inoltre, anche per AUR è descritta la capacità di indurre la sintesi di fattori di crescita neurotrofici. Questo vale sia per BDNF (Fukurawa et al., 2020), sia per GDNF, la cui regolazione è nuovamente indotta attraverso la via PKA/ERK/CREB (Mitroshina et al., 2019). Ne consegue un ruolo neuroprotettivo e di potenziamento della memoria, che si osserva su modello animale costituito da topi colpiti da ischemia (Ghanbarabadi et al., 2016). La buccia del *Citrus kawachiensis* è la parte del frutto a più alto contenuto di metaboliti attivi, questo vale in particolare per il flavedo, cioè la parte esterna colorata del mesocarpo e non per l'albedo, più interno. Questi tessuti contengono principalmente AUR (Okuyama et al., 2014b), che è il maggiore responsabile dell'attività antinfiammatoria. Uno studio (Igase et al., 2019) ha valutato l'effetto della somministrazione del succo di *Citrus kawachiensis* arricchito di AUR su soggetti adulti non affetti da patologie neurologiche, misurando un evidente miglioramento delle funzioni cognitive.

MIRTILLI

Le cianidine del mirtillo (*Vaccinium myrtillus*) hanno una serie di effetti utili a preservare la salute del SNC, come la riduzione dei processi di eccitotossicità, rilascio di calcio, stress a carico del reticolo endoplasmatico, con conseguente protezione dalla morte cellulare. La loro capacità di ridurre la produzione di ROS è dovuta sia all'azione sul glutammato, sia sul perossido di idrogeno e sulla deposizione di A β (Thummayot et al., 2016). In forma di cianidina 3-O-glucoside, queste sostanze acquisiscono un notevole potenziale nel prevenire l'eziopatogenesi della malattia di Alzheimer (Howes and Simmonds, 2014). Le antocianine hanno uno spiccato effetto antiossidante, in particolare presso corteccia cerebrale ed ippocampo (Pacheco et al., 2018), ma anche un effetto inibitorio sulla fosfolipasi A₂, con conseguente azione neuroprotettiva (Mecocci et al., 2014). Diversi studi animali hanno evidenziato un ottimo effetto centrale per il mirtillo, in forma di succo od estratto. I suoi attivi sono altamente biodisponibili ed in grado di superare la BEE. Una dieta costituita al 2% da mirtilli seguita per 8-10 settimane in topi invecchiati ha condotto ad un miglioramento nella memoria spaziale, associato a concentrazioni di antocianidine misurabili presso varie strutture centrali, come cervelletto, nucleo striato, corteccia ed ippocampo (Andres-Lacueva et al., 2005). Uno studio separato ha mostrato un miglioramento della memoria a lungo termine ed una protezione del DNA delle porzioni cellulari dell'encefalo dal danno da ROS a seguito di un consumo di estratto di mirtillo di 30 giorni (Barros et al., 2006).

Uno studio (Boespflug et al., 2018) svolto impiegando una polvere contenente una miscela equipartita

di due specie del genere *Vaccinium* L., cioè il *Vaccinium ashei* Reade (*tifblue*) e il *Vaccinium corymbosum* L. (*rubel*), ha valutato gli effetti del mirtillo in una coorte di anziani affetti da *mild cognitive decline*. Sono state eseguite alcune *task* mnemoniche, i cui esiti sono stati combinati con le immagini in risonanza magnetica funzionale dell'encefalo, verificando il livello di attività delle diverse aree dell'organo. Dopo un consumo di mirtillo di 16 settimane, si è osservato un miglioramento dell'attività encefalica presso il giro pre-centrale sinistro, il giro frontale mediale sinistro e il lobo parietale inferiore sinistro. Applicando un'analisi statistica più sofisticata, si è confermata la presenza di una maggiore attività del lobo parietale inferiore sinistro e del giro pre-centrale sinistro, almeno per quanto riguarda uno dei test eseguiti. Le variazioni nell'attività osservate nelle diverse aree dell'emisfero sinistro dell'encefalo sono piuttosto intense, confermando che il consumo di flavonoidi del mirtillo aumenta la perfusione d'organo. Si suppone che questo avvenga sia attraverso la regolazione delle vie di biosegnalazione cellulare di neuroni e glia che controllano la fornitura di sangue del tessuto, sia agendo a livello endoteliale per migliorare la funzionalità dei vasi cerebrali (Basu et al., 2010; Paixao et al., 2011; Stein et al., 1999). Nonostante la forza dell'associazione riscontrata tra consumo di mirtillo ed attivazione dei vasi encefalici, non si osservano miglioramenti degni di nota per la memoria procedurale. Le deboli evidenze che si sono delineate permettono, comunque, di ipotizzare un effetto che si renderebbe visibile su una popolazione più ampia, oppure in studi svolti per un periodo di tempo più lungo. Effetti simili a quello visto per i mirtillo si sono osservati, in altri studi, per il succo d'uva Concord (Krikorian et al., 2012), su pazienti anziani affetti da MCI e per il cacao ad alto contenuto di flavanoli (Francis et al., 2006), su volontari sani giovani.

3.2.5 Tè, caffè e cioccolato

La principale classe di composti polifenolici del tè verde (*Camellia sinensis*) è costituita dalle catechine, i derivati più rappresentati sono l'epigallo-catechin-gallato e l'epicatechina. La struttura chimica dell'EGCG è riportata in Figura 37 e risulta molto importante per comprendere l'effetto antiossidante di questa molecola. L'EGCG è in grado di complessare diversi tipi di ioni metallici a livello del gruppo tri-idrossilico del derivato dell'acido gallico (Williams et al., 2011). L'effetto antiossidante dell'EGCG comprende anche un'azione di *scavenger* dei ROS presso l'ippocampo, con riduzione dei fenomeni di perossidazione lipidica e una stimolazione della via anti-ROS del glutazione. L'EGCG può inibire diversi enzimi connessi allo sviluppo di neuroinfiammazione e malattia di Alzheimer, come l'acetilcolinesterasi (AChE), la β -secretasi e la γ -secretasi (Casella et al., 2017; Costa et al., 2017; Williams et al., 2011). Agli effetti di EGCG si aggiungono i contributi di altri composti antiossidanti, come l'epicatechina, che aumenta i livelli di glutazione, riducendo lo stress ossidativo e la perossidazione lipidica, come osservato su ippocampo di ratto (Williams et al., 2011). Mentre gli studi svolti sul solo EGCG hanno mostrato modifiche della perfusione encefalica ed a livello encefalografico, senza ricadute positive sulla cognizione (Casella et al., 2017), l'assunzione quotidiana di tè verde si associa ad una riduzione del declino cognitivo e del rischio

di demenza (Williams et al., 2011). Un altro studio, svolto fornendo 2g al giorno di estratto di foglie di tè, per 3 mesi, ha confermato un miglioramento nella *performance* cognitiva (Casella et al., 2017).

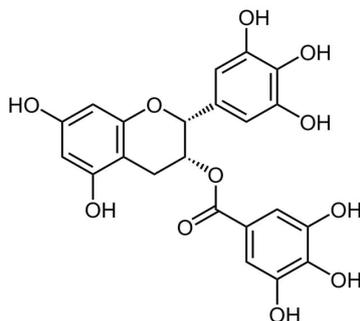


Figura 37: Struttura chimica del gallato di epigallocatechina (wikipedia.org [autore ignoto]).

Gli attivi più importanti derivati dalla pianta di cacao (*Teobroma cacao*) sono i flavanoli, sostanze anti-ossidanti ed antinfiammatorie, che possono migliorare l'angiogenesi cerebrale e la circolazione nutritizia locale (Dominguez and Barbagallo, 2018), ma anche favorire l'espressione di proteine neuroprotettive e neuro-modulatorie (Sokolov et al., 2013). Il cioccolato ed il cacao apportano anche caffeina e teobromina, quest'ultima contribuisce alla neuroprotezione, alla riduzione dei fenomeni di neurotossicità ed al miglioramento del microcircolo cerebrale. Uno studio ha evidenziato, per un consumo di cioccolato abituale di due anni, una notevole riduzione del rischio di declino cognitivo, quantificato in un -41% (Dominguez and Barbagallo, 2018), mentre un secondo studio, sempre relativo ad un uso abituale di cioccolato, ha misurato un miglioramento nella *performance* cognitiva (Crichton et al., 2016). Altri studi sono stati svolti usando la sola frazione flavanolica del cioccolato, misurando un incremento nelle funzionalità cognitive in soggetti anziani ed un aumento nella perfusione cerebrale e nel flusso ematico nel tessuto nervoso (Dominguez and Barbagallo, 2018).

La caffeina (vedasi Figura 38) è contenuta in notevole quantità presso le piante di tè, caffè e cacao, ma il caffè ne è sicuramente la fonte alimentare più importante. Il ruolo più noto per la caffeina è di antagonista purinergico a livello dei recettori *ADORA2A* per l'adenosina, ma essa riduce anche il rilascio di glutammato e la deposizione di monomeri $A\beta$ (Howes, 2013). Altri meccanismi d'azione comprendono la protezione del SNC dal danno di barriera, come osservato in modelli animali di malattia di Alzheimer e Parkinson (Howes, 2013), inoltre agisce su alcune vie di biosegnalazione: attiva la PKC, favorisce la fosforilazione di CREB e riduce la fosforilazione di alcune MAPK, come JNK ed ERK (Dominguez and Barbagallo, 2018).

3.2.6 Curcuma

La *Curcuma longa* ed il suo rizoma sono alimenti di notevole interesse, contenendo una sostanza molto nota in letteratura, la curcumina. Un ruolo importante è definito anche per i derivati curcuminoidi, che

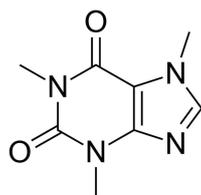


Figura 38: Struttura chimica della caffeina (Vaccinationist [b]).

sono la demetossicurcumina e la bis-demetossicurcumina, ottenute per idrolisi dei gruppi eterei presenti nella molecola originale e la calebina A, derivata dalla tautomeria cheto-enolica. La struttura chimica della curcumina, dei suoi tautomeri e dei suoi derivati curcuminoidi è riportata in Figura 39.

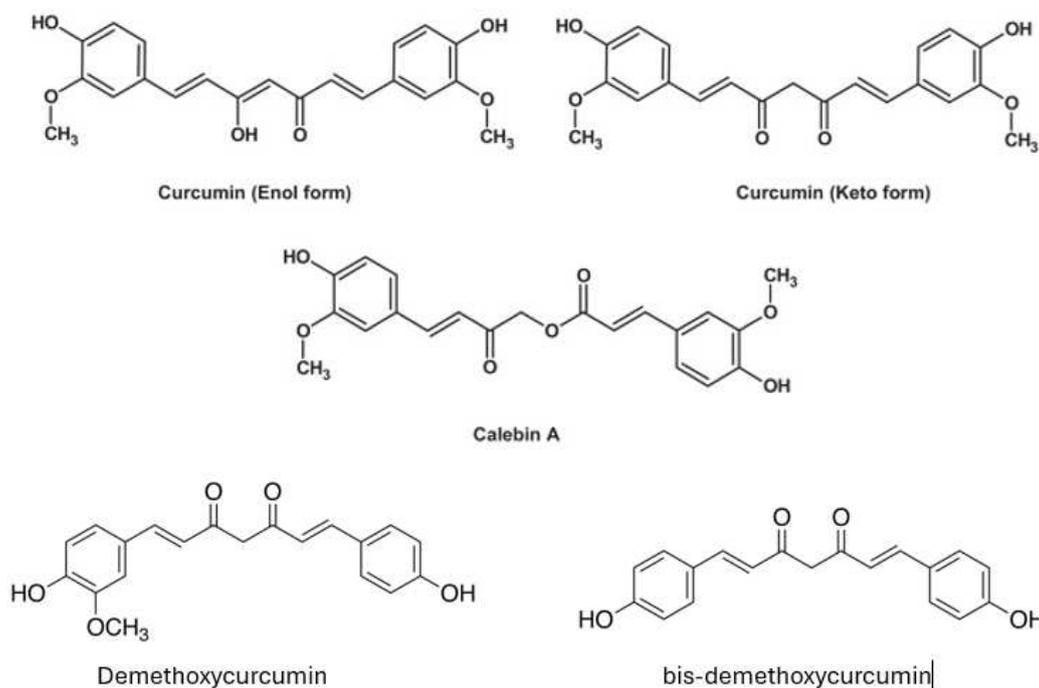


Figura 39: Struttura chimica della curcumina e dei suoi derivati (Majeed et al., 2015; Mysid; Dmacks).

Il consumo di curcuma è principalmente legato all'impiego del curry, una spezia alimentare di cui il rizoma di questa pianta è il principale componente. La curcuma ha un effetto antiossidante, poiché la curcumina, nella sua forma enolica, si comporta da *scavenger* di radicali liberi. La curcumina ed i curcuminoidi sono in grado di complessare diversi ioni metallici, a livello dei sostituenti dei due gruppi fenilici, che possono essere gruppi ossidrilici fenolici liberi o in forma di metossili sostituiti. Nella forma chetonica, che si produce per tautomeria, anche i due ossigeni carbonilici centrali possono agire da gruppi complessanti per svariati ioni metallici (Williams et al., 2011). L'attività antiossidante della curcuma è

legata al potenziamento del sistema anti-ROS del glutatione e alla riduzione nella perossidazione lipidica (Perry and Howes, 2011; Sarker and Franks, 2018; Williams et al., 2011). La curcuma può potenziare l'effetto neurogenico del BDNF, favorendo la produzione di questo importante fattore di crescita (Poulose et al., 2017). Inoltre, ha una serie di proprietà antinfiammatorie, tra cui la riduzione di attività della via di NF- κ B, di produzione di TNF- α e COX-2 e l'inibizione di alcune importanti citochine, come IL-1 α e IL-1 β , IL-6 e IL-8, anche attraverso l'azione sulla via delle MAPK (Ghosh et al., 2015; Nelson and Tablet, 2015). Infine, la curcumina sembra favorire la regolare attività dei recettori glutammatergici NMDA, che favoriscono la normale risposta delle sinapsi glutammatergiche ai fenomeni di *Long Term Potentiation* (Philips, 2017). Le popolazioni che consumano regolarmente curcuma mostrano una minore incidenza di malattia di Alzheimer e una migliore funzionalità cognitiva negli anziani non affetti da malattie neurodegenerative (Dominguez and Barbagallo, 2018). Studi svolti per testare l'efficacia della curcumina nella prevenzione del *brain aging* hanno prodotto esiti contrastanti, anche a causa della ridotta biodisponibilità di questa sostanza. Tale problematica può essere risolta associando la curcuma al pepe nero (*Piper nigrum*), il cui principale alcaloide, la piperina, sembra aumentarne la biodisponibilità del 2000% (Shoba et al., 1998).

3.2.7 Zafferano

Lo zafferano è ottenuto dalla pianta di *Crocus sativus* e contiene una serie di sostanze potenzialmente dotate di attività biologica, classificati in monoterpeni (safranale), flavonoli (kaempferolo) e carotenoidi (tra cui le crocine, una famiglia di esteri zuccherini dell'acido bicarbossilico crocetina), ma sono questi ultimi i composti di maggiore interesse. In Figura 40 si riporta la struttura chimica della crocina. Le crocine hanno una scarsa biodisponibilità orale, anche a causa dell'estensivo metabolismo intestinale che le idrolizza, liberando la crocetina (Howes et al., 2017). Questa ultima è rapidamente assorbita a livello ematico e, in forma di *trans*-crocetina, può accedere all'encefalo attraverso i plessi coroidei od oltrepassare la BEE, concentrandosi nel SNC (Hashemi and Hosseinzadehm, 2019).

Le crocine, con particolare riguardo alla *trans*-crocina-4, su cui sono stati svolti gli studi disponibili in letteratura, sono in grado di proteggere il SNC da diversi meccanismi di danno legati all'insorgenza della malattia di Alzheimer, tra cui la formazione e la deposizione di A β (Howes et al., 2017; Howes and Simmonds, 2014), proteggendo dalla neurotossicità della proteina amiloide e degli eccessi del neurotrasmettitore glutammato (Bharate et al., 2018). Le crocine mostrano un'azione antinfiammatoria, riducendo l'espressione di NO, TNF- α e IL-1 β (Moshiri et al., 2015). La crocetina mostra, a sua volta, specifici meccanismi d'azione: condivide con la crocina l'effetto antinfiammatorio e la capacità di ridurre la tossicità della proteina A β , ma a questo aggiunge una marcata attività antiossidante, aumentando i livelli di GSH e superossido-dismutasi (Hashemi and Hosseinzadeh, 2019). Vanno, inoltre, considerate le attività anti-ossidante e neuroprotettiva del safranale e la capacità, descritta per lo zafferano come tale,

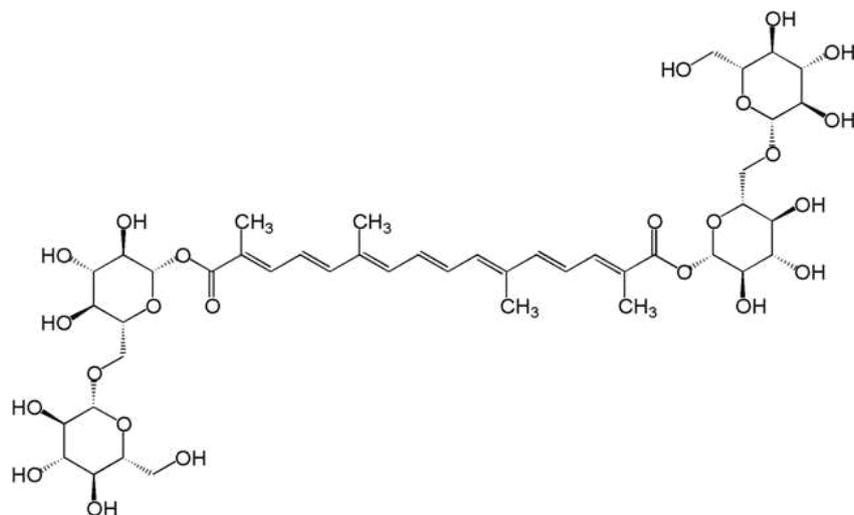


Figura 40: Struttura chimica della crocina, de-esterificando i glicosidi presenti alle estremità e liberando i relativi gruppi carbossilici si ottiene il derivato crocetina (Edgar [d]).

di inibire l'enzima AchE fino al 30% della sua funzionalità (Bukhari et al., 2018). Diversi studi svolti su modello animale hanno osservato un possibile effetto dello zafferano sulle funzioni cognitive, motivo per cui sono stati condotti anche degli studi sull'uomo, tra cui uno svolto su pazienti affetti da malattia di Alzheimer, osservando una migliorata funzionalità del SNC (Howes et al., 2017), oppure un secondo studio svolto su pazienti affetti da MCI trattati per 1 anno, con analoghi risultati migliorativi (Tsolaki et al., 2016).

3.2.8 Altre spezie

Alcune erbe aromatiche commestibili, largamente impiegate nella dieta, tra cui la *Salvia officinalis* e la sottospecie di questa, nota come *Salvia officinalis lavandulifolia* o spagnola, il *Rosmarinus officinalis* (anche noto come *Salvia rosmarinus*), la *Melissa officinalis* e diverse specie del genere *Mentha* mostrano uno spettro di attività che le rendono interessanti nel trattamento del *brain aging*. Tutte queste piante appartengono alla famiglia delle Lamiacee, anche note come Labiate, esse contengono oli volatili lipofili, composti principalmente da metaboliti monoterpenici, che penetrano facilmente nella via transcutanea e possono concentrarsi nel SNC, ivi svolgendo le proprie attività benefiche. I monoterpeni hanno diverse proprietà favorevoli, ad esempio sono inibitori non competitivi dell'enzima AchE, come si osserva per α -pinene e 1,8-cineolo (Howes and Perry, 2011), sono modulatori dell'attività nicotinic, come nel caso del timochinone, che agisce da antagonista dei recettori $\alpha 7$ (Ibrahim et al., 2016). Il composto meglio studiato di questa famiglia è l'1,8-cineolo, anche noto col nome comune di eucaliptolo (vedasi Figura 41). Questa molecola ha un'attività antinfiammatoria, potendo agire sulla via di NF-kB, con riduzione nella produzione di TNF- α , IL-1 β e IL-6 e sulla via di ERK (Howes, 2018; Seo et al., 2018), un'attività

antiossidante che si esplicita nella riduzione diretta dello stress ossidativo con azione *scavenger* dei ROS (Porres-Martinez et al., 2016; Kim et al., 2014) e un'attività modulatrice sui *transient potential receptors* (TRP), collegati anche al segnale glutammatergico centrale (Jiang et al., 2016). L'1,8-cineolo si trova alla concentrazione più elevata nella salvia officinale, ma in quantità apprezzabile anche nella salvia spagnola e nel rosmarino. Gli studi svolti su questo composto dimostrano che può essere assorbito nella via inalatoria, raggiungere il distretto ematico e superare la BEE. A livello centrale si osserva un miglioramento della *performance* cognitiva che risulta correlato alle concentrazioni ematiche di questo composto (Okello and Howes, 2018).

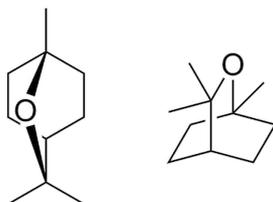


Figura 41: Struttura chimica dell'1,8-cineolo od eucaliptolo, un monoterpene (Edgare [e]).

L'acido rosmarinico (vedasi Figura 42) si trova principalmente nella pianta della *Mentha spicata*, ma anche nella salvia officinale e nel rosmarino. Esso mostra un assorbimento limitato attraverso la BEE, ma anche una serie di attività interessanti nel SNC, tra cui: inibitore di AchE, antiossidante, neuroprotettivo e in grado di prevenire la deposizione di $A\beta$ (Howes and Houghton, 2012; Mecocci, 2014; Perry and Howes, 2011; Williams et al., 2011). Gli estratti di salvia spagnola e salvia officinale migliorano le funzioni cognitive, in particolare memoria e stato di allerta, sia su soggetti sani di giovane età, sia su soggetti anziani non affetti da forme neurodegenerative. In aggiunta, gli stessi, testati su popolazione affetta da malattia di Alzheimer, sembrano migliorare la compromissione cognitiva e la risposta comportamentale agli stimoli (Perry and Howes, 2011). Relativamente agli estratti di rosmarino, essi hanno dimostrato di incentivare la memoria e l'attenzione in una popolazione anziana sana (Nematollahi et al., 2018). L'olio di menta piperita è stato testato sia in somministrazione inalatoria, sia nella via orale. Il primo studio ha osservato che la componente volatile migliora la memoria e lo stato di vigilanza (Okello and Howes, 2018), mentre nel secondo caso si è visto un potenziamento nello svolgimento di *task* cognitive, con aumento della *performance* media e riduzione della fatica mentale che ne consegue (Kennedy et al., 2018). Per concludere, gli estratti di melissa hanno, a loro volta, prodotto un miglioramento nella cognizione, relativamente a memoria, capacità processuale ed attenzione, sia in soggetti anziani sani, sia in modelli di malattia di Alzheimer (Howes and Houghton, 2012).

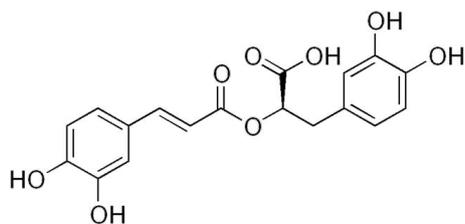


Figura 42: Formula di struttura dell'acido rosmarinico (Edgar [f]).

3.2.9 Piante nootrope

L'azione nootropica di una sostanza o di un alimento corrisponde all'effetto di accrescere le capacità cognitive di colui che lo assume. Moltissime sono le piante per cui sono stati evidenziati effetti nootropici, alcune molto note e diffuse a livello mondiale, altre provenienti dalla medicina tradizionale cinese o dalla medicina Ayurveda indiana, se ne riportano gli esempi più significativi.

- La pianta di *Ginkgo biloba* è stata usata tradizionalmente sia in Europa, sia negli Stati Uniti, per migliorare il declino cognitivo dell'anziano e rallentare l'insorgenza di forme patologiche di demenza, tra cui demenza vascolare e malattia di Alzheimer (Silberstein et al., 2011), anche se gli studi svolti ad hoc hanno avuto esiti contrastanti. Il consumo di *Ginkgo* per un periodo di 14 giorni ha mostrato di migliorare la memoria procedurale e le relative *task* (Silberstein et al., 2011). Tra gli effetti positivi che il *Ginkgo* produce a livello di SNC vi sono: riduzione dei fenomeni di apoptosi di origine mitocondriale, riduzione di attività della caspasi-3 e rallentamento nei fenomeni di produzione ed accumulo di proteina $A\beta$ amiloide (Christen, 2004). A questo si aggiunge l'attività di inibizione della MAO e dei trasportatori di *uptake* delle monoammine (noradrenalina, dopamina e serotonina) che è stata osservata, ad oggi, solo *in vitro* (Fehske et al., 2009). L'attività centrale si esplicita in diverse aree dell'encefalo, a carico dei lobi parietale, temporale, frontale ed occipitale della corteccia, ma anche presso la struttura dell'ippocampo dove aumenta la trasmissione colinergica e l'espressione di recettori muscarinici (Christen, 2004; DeKosky et al., 2008; Luo et al., 2002; Taylor, 1986). L'attività del *Ginkgo* sembra imputabile ad alcuni suoi metaboliti attivi, in particolare terpenoidi, come il ginkgolide ed il bilobalide, ritenuti responsabili dell'inattivazione della caspasi-3 e dell'incremento nelle capacità mnemoniche (Christen, 2004; Coombes, 1994).
- Il *Panax ginseng* è una pianta della tradizione medicinale cinese, da sempre usata per migliorare la funzione cognitiva e per le sue proprietà antiossidanti (Xie et al., 2005). Un moderno studio condotto somministrando ginseng, per 12 settimane, su una popolazione affetta da malattia di Alzheimer ha mostrato un incremento delle capacità cognitive, con andamento dose-dipendente (Heo et al., 2008; Lee et al., 2008; Liu et al., 2011). Le sostanze attive del ginseng sono le sue saponine, note come ginsenosidi, tra cui il panaxatriolo, il panaxadiolo e l'acido oleanolico. Il

panaxatriolo ed il panaxadiolo sembrano in grado di intervenire sulla neurotrasmissione, regolando l'*uptake* di noradrenalina, serotonina, GABA e dopamina (Tsang et al., 1985).

- La *Centella asiatica* viene spesso consumata come succo dell'intera pianta, contiene diverse saponine, di cui le più importanti sono: medacoside, acido asiatico, asiaticoside e acido triterpenico. Il meccanismo d'azione di questa pianta comprende l'inibizione dell'enzima AchE, tanto che la stessa si è dimostrata in grado di mitigare i *deficit* mnemonici indotti somministrando scopolamina (Kulkarni et al., 2012; Sharma et al., 2005).
- La *Glycyrrhiza glabra* viene consumata in forma del suo più noto derivato, la liquirizia, contiene diversi attivi, come flavononi, isoflavoni, composti fenolici e l'acido glicirretinico. In modello animale sembra mitigare la perdita di memoria (Dhingra et al., 2004).
- La *Nicotiana tabacum* e le altre piante contenenti l'alcaloide nicotina (*Nicotiana rustica*, *Duboisia hopwoodii*, *Asclepias syriaca*) sono state studiate per le loro capacità di potenziare la memoria e l'apprendimento, sia in soggetti sani, sia in affetti da malattia di Alzheimer. L'attività principale è l'agonismo nicotinico centrale imputabile all'alcaloide, che conduce alla *down-regulation* dei relativi recettori (Levin, 1992; Lloyd et al., 2000). Si tratta di piante che manifestano un potenziale d'abuso.

4 FARMACI SPERIMENTALI

Si definiscono geroprotettori quei farmaci che rallentano il tasso di invecchiamento dell'organismo e riducono l'incidenza di malattie associate, prima fra tutte la malattia di Alzheimer. Per lo sviluppo di geroprotettori, la ricerca si sta concentrando su composti che estendono la durata media di vita degli organismi su cui vengono testati, poiché si ritiene che questa azione sia associata ad un effetto sulle malattie croniche tipiche dell'invecchiamento. Non è noto se questi composti agiscano in modo aspecifico su tutti i tessuti dell'organismo, oppure se intervengano selettivamente su *target* espressi solo in alcuni distretti, tuttavia è stato osservato che l'azione riguarda ben definiti meccanismi di regolazione, tra cui la via della *AMP-activated kinase* e quella di mTOR (Johnson et al., 2013; Salminen and Kaarniranta, 2012). I composti con azione di geroprotettori che intervengono specificamente sul SNC sono noti come geroneuroprotettori (GNPs), si tratta di composti di interessante potenziale farmacologico, accomunati da quattro caratteristiche essenziali. I GNPs intervengono con azione migliorativa sui diversi processi di danno che si manifestano nell'encefalo all'avanzare dell'età, non sono specifici per la fisiopatogenesi di un particolare disturbo neurologico, ma agiscono su processi trasversali comuni a molte malattie neurodegenerative ed all'invecchiamento fisiologico dell'encefalo, devono agire sulle malattie modificandone la prognosi o la gravità in modo misurabile e funzionare sia qualora il trattamento sia iniziato su soggetti giovani all'apparenza sani, sia su soggetti già in avanzata età o in cui si osservino già i segni della patologia (Moskalev et al., 2015).

4.1 GEROPROTETTORI ANTI-ALZHEIMER

Tra i candidati farmaci con potenziale di geroneuroprotettori, è possibile citare tre derivati di interesse: CAD31 e J147, derivati della curcumina e CMS121, derivato dalla fisetina (Schubert et al., 2018), la cui struttura chimica è visibile in Figura 43. Questi composti hanno mostrato di essere efficaci in diversi modelli animali di malattia di Alzheimer, in particolare sui topi, con miglioramento della memoria, mantenimento delle strutture sinaptiche, riduzione dell'infiammazione e rimozione di peptidi neurotossici, ma anche con una generale estensione della durata media della vita e la capacità di ritardare una serie di meccanismi molecolari di danno tipici dell'invecchiamento (Currais et al., 2015; 2018; Daughtery et al., 2017; Goldberg et al., 2018; Prior et al., 2014). J147 è il composto più studiato, agisce su una subunità della ATP-sintetasi mitocondriale, la sua capacità di estensione della durata media della vita è stata misurata sui vermi (Goldberg et al., 2018). CAD31 condivide molte attività del composto J147 da cui deriva, con aggiunta la capacità di stimolare la divisione delle staminali neuronali (Daughtery et al. 2017, Prior et al., 2016). Infine, CMS121 mostra uno spettro di attività paragonabile ai precedenti, ma è una molecola più potente.

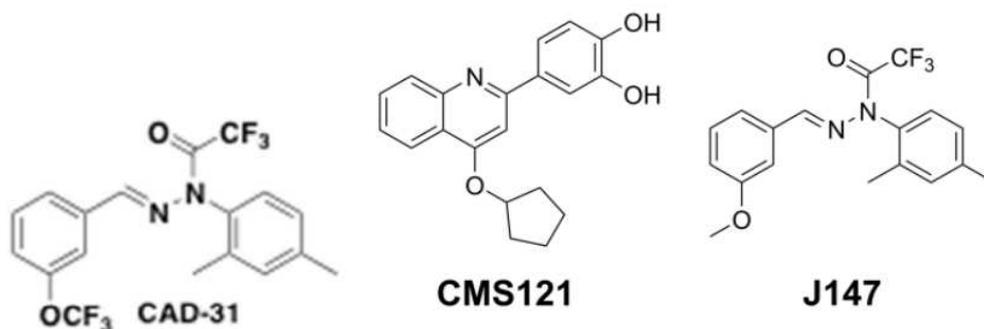


Figura 43: A sinistra: struttura chimica del derivato curcuminoide CAD31 (Prior et al., 2016), a destra: struttura chimica del derivato curcuminoide J147 e di CMS121, derivato della fisetina (Kepchia et al., 2021).

In un recente studio (Kepchia et al., 2021), due dei composti citati, attualmente in studio per il trattamento della malattia di Alzheimer, sono stati testati su un modello animale di invecchiamento accelerato, i topi SAMP8, ottenendo evidenze di promettente attività preventiva su fenomeni di *brain aging*, attraverso un'azione che si esplicita sia a livello cerebrale, sia a livello renale.

L'importanza dei fenomeni di disfunzione del distretto renale è spesso sottovalutata nell'anziano: la condizione più comune è la malattia renale cronica, un complesso spettro di processi patologici differenti, che esitano nella perdita dell'integrità funzionale e strutturale dell'organo, con riduzione della velocità di filtrazione glomerulare e possibile sviluppo di tossicità per mancata eliminazione dei metaboliti azotati (Coresh et al., 2007). A questo si aggiunge la nefropatia diabetica, che colpisce il 40% dei soggetti affetti da diabete di tipo 2. Queste condizioni di malattia renale si associano a disfunzioni neurologiche, tra cui l'insorgenza di MCI ed un aumento del rischio di demenza, che è stato stimato in un 37% a distanza di 6 anni (Anand et al., 2014; Bugnicourt et al., 2013; Mazumder et al., 2019; Seliger et al., 2004).

Nello studio sono stati impiegati i candidati farmaci J147 e CMS121, per i quali studi svolti su *Drosophila melanogaster* hanno dimostrato un prolungamento dell'aspettativa di vita media, attraverso costruzione delle curve di Kaplan-Meier (vedasi Figura 44). Questo incremento è stimato in un 12.8% per J147 ed in un 8.46% per CMS121 (Flatt, 2020). I due composti hanno mostrato di migliorare una serie di processi chiave connessi all'invecchiamento su coltura cellulare, tra questi: riduzione del metabolismo energetico, stress ossidativo, proteotossicità, riduzione nella disponibilità di fattori trofici, infiammazione (Prior et al., 2014).

I due candidati farmaci alterano l'espressione di una serie di proteine importanti per i fenomeni di invecchiamento, in alcuni casi aumentando ed in altri riducendo la loro espressione, in modo differente tra il tessuto encefalico e quello renale. Ne risulta che il meccanismo d'azione dei due composti a livello di SNC e rene potrebbe essere differente, pur rimanendo non completamente definito. Un effetto particolarmente interessante riguarda l'enzima COX-2, i cui livelli normalmente crescono nell'encefalo degli animali

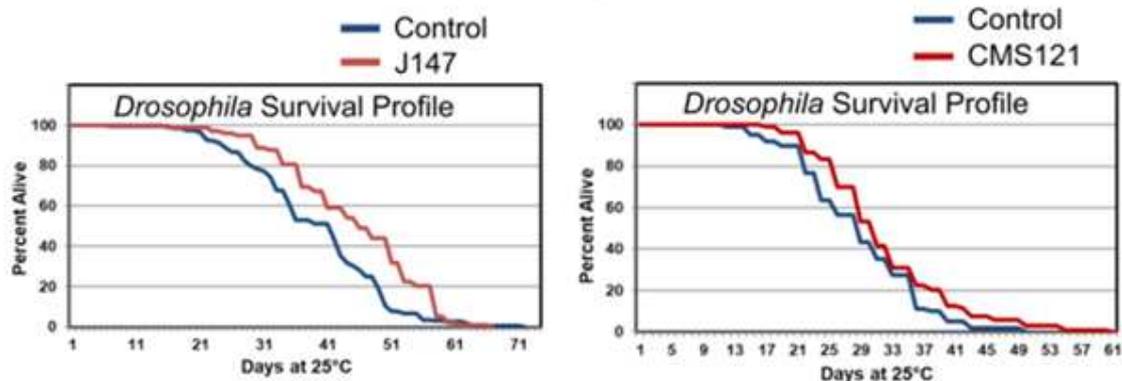


Figura 44: Analisi di Kaplan-Meier per l'aspettativa di vita di esemplari di *Drosophila melanogaster* dopo somministrazione di J147 e CMS121 (Kepchia et al., 2021).

in tarda età, con un aumento stimato circa nel 70% e diminuiscono presso i reni. I due candidati farmaci hanno dimostrato di rallentare la crescita nella concentrazione encefalica di COX-2 negli animali vecchi, è stato misurato un aumento del 36% impiegando CMS121 e del 4% impiegando J147, con un impatto positivo nella riduzione dei fenomeni neuroinfiammatori. A livello renale, invece, i livelli di COX-2 sono cresciuti, fino a raggiungere concentrazioni simili a quelle degli animali giovani. Bisogna ricordare che in questo distretto la COX-2 ha un significato protettivo per la funzionalità dell'organo, essendo coinvolta nella produzione di prostaglandine, necessarie a mantenere un'adeguata perfusione, grazie all'effetto vasodilatatore (Lucas et al., 2019), mentre una sua ridotta attività ha un impatto deleterio sull'omeostasi dell'organo. Nonostante l'aumento dei livelli di COX-2, sussiste un effetto antinfiammatorio dovuto alla riduzione delle concentrazioni di TNF- α e dell'attività della via di NF-kB, anche se la significatività statistica si è raggiunta solo con J147. A livello del SNC, gli effetti più interessanti riguardano la variazione nella concentrazione di alcune *heat shock proteins*, la cui espressione di norma cala in tarda età, compromettendo alcuni meccanismi, tra cui la degradazione proteica ed il corretto *folding* delle nuove proteine sintetizzate. Le alterazioni nell'espressione genica osservate suggeriscono che J147 e CMS121 riducano l'attività della via delle MAPK, in particolare agendo sui mediatori ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) e JNK2 (*c-Jun N-terminal Kinase 2*) e di mTOR, i cui *pathway* sono stati ampiamente correlati ai processi di invecchiamento dell'encefalo. A livello renale, il fenomeno più visibile è la ridotta espressione dei mediatori di infiammazione, ad esempio nel trattamento con CMS121 questo avviene in modo significativo per: TNF- α , iNOS, 5-LOX (Arachidonato-5-lipossigenasi), p65, CC1 (*Cleavage Caspase 1*), RIG-1 (*Retinoic acid-Inducible Gene-1*), mentre nel trattamento con J147 l'unico dato significativo riguarda CC1.

4.2 FARMACI E COMPOSTI SENOLITICI

Esistono due possibili approcci per trattare la senescenza cellulare. Il primo è la cancellazione genetica, basata sull'inserimento di geni che codificano per proteine che, una volta tradotte, inducono la morte cellulare. Queste proteine sono attivate dagli stessi promotori endogeni che controllano l'espressione di fattori proteici tipici del processo della senescenza, come p16, p21 e p53 (Baker et al., 2011; Chinta et al., 2018; Demaria et al., 2014; Hashimoto et al., 2016). Il secondo approccio consiste nelle senoterapie, che sfruttano farmaci ad azione senomorfica o senolitica. I farmaci senomorfici o senostatici sono composti in grado di alterare il fenotipo delle cellule senescenti, evitando lo sviluppo del SASP e le sue deleterie conseguenze, mentre i senolitici si occupano di eliminare attivamente le cellule senescenti, agendo a livello dei meccanismi che le proteggono dall'apoptosi. Di seguito si elencano alcuni farmaci e composti con potenziale azione senolitica.

- L'associazione di dasatinib e quercetina (vedasi Figura 45) è tra gli approcci meglio studiati. Il dasatinib è un inibitore di chinasi, approvato nella *targeted therapy* anti-tumorale, la sua attività è di inibitore di diverse tirosin-chinasi, incluse quelle della famiglia di Src e della chinasi chimerica Bcr-Abl. La quercetina, invece, agisce sulle proteine Bcl-2 anti-apoptotiche e sulla via di AKT. Questi due senolitici si impiegano sempre in forma di *cocktail*, perché le loro azioni sono complementari: ad esempio, il dasatinib aiuta ad eliminare i pre-adipociti senescenti, ma non ha alcun effetto sulle cellule HUVEC endoteliali, mentre la quercetina ha un'azione concomitante (Dorsey et al., 2000; Granado-Serrano et al., 2006; Louis J. Lombardo et al., 2004; Zhu et al., 2015). Uno studio recente (Ota and Kodama, 2022) si è occupato di confrontare un modello animale rappresentativo di un invecchiamento normale (i topi SAMR1) con un modello di invecchiamento accelerato e sbilanciato (i topi SAMP10), valutando in quest'ultimo il potenziale terapeutico dell'associazione dasatinib-quercetina, in particolare presso l'area ippocampale del SNC ed il muscolo scheletrico. Le cellule senescenti sono state evidenziate nel tessuto ippocampale valutando la positività al marcatore SA- β -gal, osservando un numero significativamente minore nei SAMR1 e nei SAMP10 sottoposti a trattamento. Analoghi risultati si sono ottenuti misurando la concentrazione ippocampale della proteina p16^{Ink4a}, tipicamente espressa nei processi di senescenza (vedasi Figura 47). A livello muscolare non si sono ottenuti dati di interesse: non è stato possibile osservare cellule esprimenti SA- β -gal, né è stata osservata una variazione nell'espressione di p16^{Ink4a}. Questi dati hanno suggerito che l'azione di dasatinib-quercetina si esplicitasse selettivamente sulle funzioni del SNC e non sulla muscolatura scheletrica. Il solo dasatinib (50 nM), la sola quercetina (10 μ M) e l'associazione dei due sono stati testati su linee precursori di cellule muscolari e neuronali (vedasi Figura 47). In tutti e tre i casi si è constatata la capacità di indurre i processi di apoptosi e ridurre la percentuale di cellule positive alla SA- β -gal, in ambo le linee cellulari, anche se risultati ottimali si sono osservati

per la sola associazione. Di conseguenza, non è stato possibile definire con certezza il meccanismo della neuro-selettività di dasatinib-quercetina osservata in vivo, che rimane ignoto.

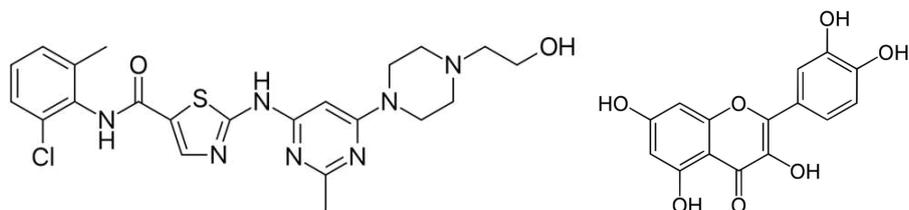


Figura 45: A sinistra: struttura chimica del dasatinib (Fvasconcellos [b]), a destra: struttura chimica della quercetina (Yikrazuul [d]).

- Il farmaco sperimentale navitoclax (vedasi Figura 46) appartiene ad una più ampia famiglia di composti inibitori delle proteine Bcl ad azione anti-apoptotica. Il navitoclax è un inibitore non selettivo della proteina Bcl-XL (*B-cell Lymphoma eXtra Large*) e di Bcl-2, risultando attivo dopo somministrazione orale (Olterdorf et al., 2005; Tse et al., 2008). L'azione di inibizione di Bcl-XL, molto espressa a livello delle piastrine, conduce frequentemente all'insorgenza di trombocitopenia, il più comune effetto collaterale attribuito a questo farmaco, che ne determina le dosi massime impiegabili in terapia (Mason et al., 2007; Shoemaker et al., 2006; Zhang et al., 2007). Anche il navitoclax mostra selettività solo su alcuni tipi di cellule senescenti, eliminando le cellule endoteliali HUVEC, ma non i pre-adipociti (Zhu et al., 2016).

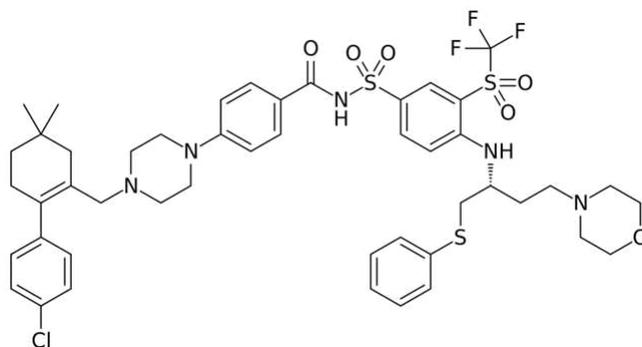


Figura 46: Struttura chimica del navitoclax (Edgar [b]).

- La fisetina è in grado di attivare la morte cellulare per apoptosi anche in cellule che non esprimono la caspasi-3 e p53, agendo sulla caspasi-7 ed inibendo l'autofagia (Yang et al., 2012). La sua azione senolitica è descritta sulle cellule HUVEC, ma non sui pre-adipociti o sulle cellule IMR90, derivate dal tessuto tumorale del polmone fetale (Zhu et al., 2017).

- La piperlongumina è un derivato di piante del genere *Piper*, sembra agire in sinergia con il navitoclax (Wang et al., 2016). La piperlongumina ed i suoi analoghi agiscono destabilizzando la proteina 1 di resistenza all'ossidazione (OXR1) e sensibilizzando le cellule senescenti al danno ossidativo (Liu et al., 2018; Zhang et al., 2018).
- In alcuni studi la HSP90 sembra intervenire nella sopravvivenza delle cellule senescenti, sia a causa della stabilizzazione dei fattori della via di AKT e della chinasi Raf-1, sia per l'azione sulla via apoptotica, conseguente al sequestro di Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*), che viene allontanato dalla caspasi-9, evitandone l'attivazione. Per questo, la geldanamicina, un inibitore di HSP90, potrebbe avere un'azione senolitica (Basso et al., 2002; Pandey et al., 2000; Schulte et al., 1995).
- Il peptide interferente FOXO4-DRI agisce sul gene FOXO4 (*Forkhead box O4*), che codifica per una proteina, la cui interazione con il fattore p53 garantisce la sopravvivenza delle cellule senescenti. L'interferenza con il trascritto di FOXO4 consente l'attivazione della via di morte cellulare indotta dalla p53 (Baar et al., 2017).
- I derivati di coniugazione galattosio-duocarmicina modificata (GMD) sono profarmaci usati nella terapia ADEPT (*Antibody-Directed pro-Drug Enzyme Therapy*). Le duocarmicine sono note per essere potenti sostanze citotossiche, usate nella terapia di tumori solidi, grazie alla loro capacità di alchilare il DNA. Il coniugato galattosio-duocarmicina modificata può essere attivato per azione della β -galattosidasi e, normalmente, svolge la propria azione farmaceutica attraverso il danno genomico (Boger et al., 2002). Nelle cellule senescenti, la produzione di SA- β -gal potrebbe garantire la liberazione della duocarmicina, con conseguente effetto citotossico specifico a carico delle cellule senescenti (Guerrero et al., 2020).

Un ultimo possibile approccio senolitico è la terapia cellulo-mediata. Nella fisiologia dell'individuo, l'eliminazione delle cellule senescenti è dovuta all'azione di: cellule *Natural Killer* (NK), macrofagi e linfociti T, nonostante queste funzioni agiscano in maniera non ottimale, a causa dei diversi meccanismi che le cellule senescenti sviluppano per evadere l'immunosorveglianza. Questi meccanismi comprendono una maggiorata espressione di ligandi ad azione inibitoria sulle cellule del sistema immunitario ed una ridotta produzione di proteine ad azione attivatrice, ma possono anche essere conseguenza della senescenza delle stesse cellule immunitarie, dovuta all'invecchiamento. Il potenziamento dell'immunosorveglianza verso le cellule senescenti può essere indotto dall'esterno, attraverso il ricorso ad una terapia cellulare. Un esempio di meccanismo endogeno di potenziamento della risposta immunitaria si può osservare nel riconoscimento dell'antigene di superficie DPP4 (DiPeptidil-Peptidasi-4), da parte di anticorpi che consentono lo sviluppo di citotossicità anticorpo-mediata delle cellule NK (Kim et al., 2017). A livello di

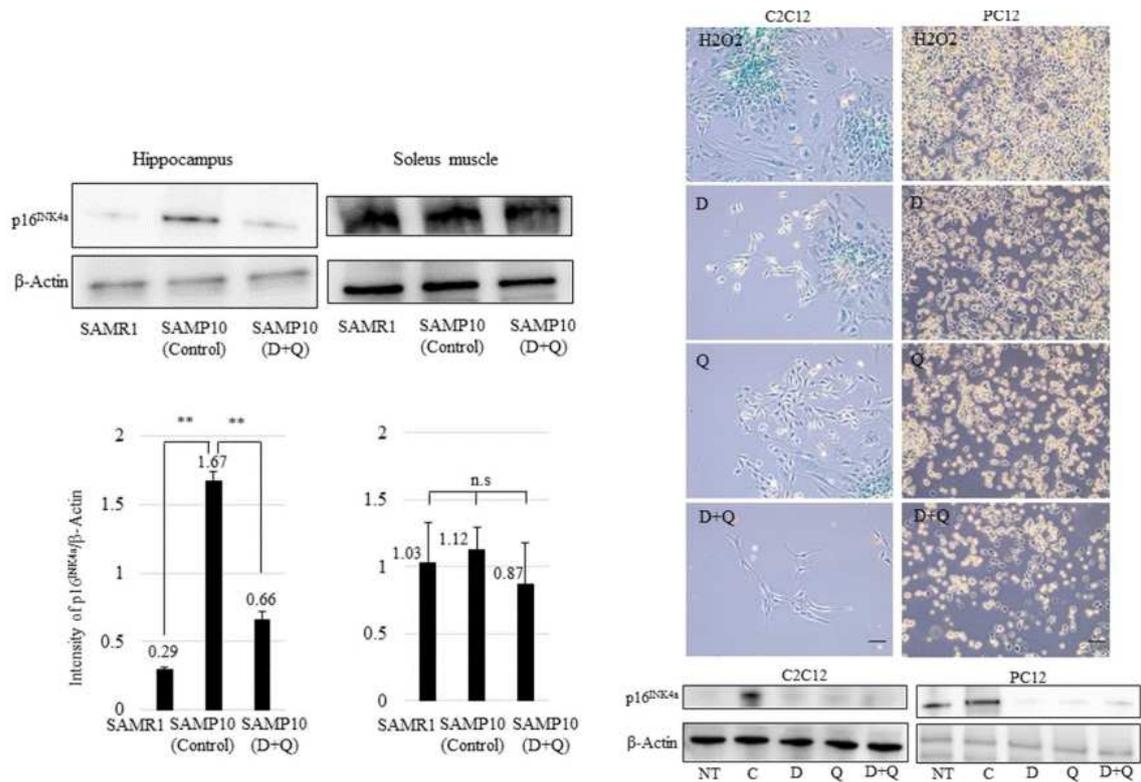


Figura 47: A sinistra: misurazione della concentrazione di β -actina e chinasi p16 in topi SAMR1 e in topi SAMP10 dopo trattamento con dasatinib-quercetina o placebo e relativa interpretazione tramite istogramma, sono evidenti gli effetti migliorativi del trattamento senolitico (Ota and Kodama, 2022). A destra: misurazione della concentrazione dei medesimi marcatori, in precursori della linea muscolare C2C12 ed in precursori della linea neuronale PC12, in condizioni di senescenza indotta con H₂O₂, in assenza o presenza di trattamento con dasatinib, quercetina ed associazione dei due (Ota and Kodama, 2022).

terapia esogena, è possibile sfruttare la tecnica CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cells*), che impiega linfociti T modificati, esprimenti un dominio di riconoscimento direzionato verso uno specifico antigene (Rafiq et al., 2019). Il legame antigene-sito di riconoscimento attiva il dominio zeta del co-recettore delle cellule T CD3, espresso dai CAR-T, consentendo l'attivazione della funzione citotossica di queste, che elimina la cellula riconosciuta. Per agire selettivamente sulle cellule senescenti è possibile direzionare i CAR-T verso il recettore per l'attivazione del plasminogeno uPAR (*urochinas type Plasminogen Activator Receptor*), come accaduto in alcuni studi su modelli animali, tra cui topi affetti da carcinoma polmonare e cirrosi epatica, dove si è osservato un miglioramento delle patologie associate alla senescenza (Amor et al., 2020).

L'associazione tra senescenza cellulare e malattia di Alzheimer è legata all'accumulo di OPC (cellule precursori degli oligodendrociti) senescenti, segno riconosciuto sia in modelli animali di malattia, tra cui

i topi, sia studiando l'encefalo di pazienti umani. L'eliminazione di OPC senescenti, ottenuta somministrando l'associazione dasatinib-quercetina, ha mostrato di ridurre la neuroinfiammazione e migliorare i *deficit* cognitivi, senza agire direttamente né sugli astrociti né sulla microglia (Zhang et al., 2019). L'accumulo di grovigli neurofibrillari è, a sua volta, associato alla senescenza delle cellule del SNC, come osservato su campioni di tessuto umano in studi *post-mortem*, che hanno correlato l'insorgenza di paralisi sopranucleare progressiva (PSP) con l'espressione della proteina p16, comune biomarcatore di senescenza. La somministrazione intermittente dell'associazione dasatinib-quercetina su topi transgenici usati come modello animale di PSP ha mostrato un miglioramento nella sua eziopatogenesi, con riduzione nella perdita neuronale, minore densità dei grovigli di proteina tau ed attenuazione nell'allargamento del sistema ventricolare (Musi et al., 2018).

L'impiego terapeutico di senolitici nel trattamento del *brain aging* e delle patologie che ne conseguono mostra diverse difficoltà. Ad esempio, esiste un problema di biodisponibilità, in particolare per quei farmaci che, dovendo accedere al SNC, devono superare la BEE, inoltre possono esserci effetti differenti, da composto a composto, su varie tipologie di cellule e tessuti, fino al possibile sviluppo di tossicità. Le cellule senescenti presentano tutte il fenotipo SASP, ma la composizione degli antigeni espressi è estremamente eterogenea, con impossibilità di individuare un marcatore universale che consenta di intervenire su tutte le cellule. Gli studi disponibili in letteratura usano modelli differenti di senescenza, variando da caso a caso sia le cellule coinvolte nel fenomeno, sia gli stressori utilizzati per indurlo (Musi et al., 2018). Inoltre, l'uso di farmaci e composti differenti può portare ad un'azione selettiva solo su alcuni tipi cellulari (Walton et al., 2020). Per evitare i potenziali effetti tossici, appare fondamentale la definizione di protocolli posologici che consentano di produrre un'elevata efficacia limitando la tossicità, ad esempio ricorrendo a somministrazioni acute ripetute di dosi maggiori, piuttosto che ad un uso cronico di farmaco a posologia ridotta (Jeon et al., 2017). In terzo luogo, in molti casi di patologia si osserva la comparsa di fenomeni di senescenza a carico dei neuroni, la cui eliminazione è particolarmente problematica, poiché i fenomeni di neurogenesi sono marginali, riguardando solo alcune specifiche aree del SNC, dunque spesso i neuroni eliminati non sono rimpiazzati. Il rischio che, nel lungo termine, l'eliminazione dei neuroni senescenti conduca ugualmente a *deficit* cognitivi esiste e non è mai stato appieno valutato dagli studi disponibili.

4.3 LA METFORMINA

La metformina (vedasi Figura 48) è un farmaco della categoria delle biguanidi, usato come trattamento di base nel diabete di tipo 2, grazie all'azione su AMPK, un fondamentale regolatore delle vie cataboliche cellulari. È noto in letteratura che la metformina ha un'azione senostatica (Moiseeva et al., 2013). Il suo profilo di sicurezza è molto favorevole, contrariamente a quanto visto per i più comuni farmaci senolitici, che possono avere una tossicità rilevante (Blagosklonny, 2017; Fontana et al., 2018; Lòpez-Otìn et al., 2016; Selvarani et al., 2021). In un recente studio su modello animale (Fielder et al., 2022), il trattamento

con metformina ha mostrato un effetto simile a quello osservato nella terapia senolitica standard, con cui è stato confrontato, ma ha prodotto anche una riduzione persistente nel fenotipo SASP, diminuendo i livelli di IL-17, chemochina CCL2 e TNF- α . Gli effetti migliorativi ottenuti sono risultati visibili e stabili ad un anno di distanza dal termine del *follow-up*. Il meccanismo d'azione della metformina è risultato meno specifico rispetto a quello dei senolitici, che esplicano la propria funzione solo in alcuni tessuti e in determinati tipi cellulari, permettendo di trattare la senescenza a livello epatico, muscolare o cerebrale.

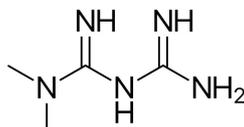


Figura 48: Struttura chimica della metformina (Fvasconcellos [c]).

Il primo meccanismo d'azione proposto per giustificare l'azione senostatica della metformina è l'inibizione del complesso I della catena respiratoria, con conseguente riduzione nella produzione mitocondriale di ROS e inattivazione della via di NF- κ B, questo effetto è confermato da studi *in vitro*, ma solo ad elevata concentrazione (Moiseeva et al., 2013). È stato osservato che un trattamento a lungo termine con metformina è in grado di ridurre la concentrazione di ROS e di una serie di citochine tipiche del fenotipo SASP nei fibroblasti senescenti (Felder et al., 2022). La somministrazione di metformina sembra attivare due specifiche *pathway* di risposta allo stress: la via di detossificazione dei ROS e la via di mTOR, che controlla lo stato di nutrizione cellulare. Viceversa, non sembra in grado di contrastare la produzione mitocondriale di perossidi, né di ripristinare eventuali disfunzioni a carico di questi organelli. Si pensa che il principale meccanismo d'azione *in vivo* dipenda dalla riduzione nella produzione non mitocondriale di ROS, principalmente legata alla via della NADPH ossidasi-4 (NOX4). A conferma di quanto ipotizzato, il trattamento con metformina riduce l'espressione di NOX4 in cellule senescenti e da ciò consegue un miglioramento del fenotipo SASP, in particolare attraverso una minore produzione di SA- β -gal e di IL-6.

Il principale effetto terapeutico della metformina è la sua capacità di migliorare la sensibilità insulinica dei tessuti, che è profondamente connessa al *brain aging*. In diverse specie animali si è osservata la capacità di questo farmaco di estendere l'aspettativa di vita (Chaudhari et al., 2020; Rotermund et al., 2018). Sono disponibili anche studi osservazionali svolti sull'uomo, molti dei quali hanno sottolineato un effetto positivo della metformina sulla salute del SNC, ad esempio il suo uso nella terapia del diabete di tipo 2 si associa ad un minor rischio di compromissione delle funzioni cognitive (Ng et al., 2014), ad una ridotta incidenza di forme di demenza (Hsu et al., 2011), compresa la malattia di Alzheimer (Cheng et al., 2014; Orkaby et al., 2017), effetti che non sembrano condivisi con altri farmaci antidiabetici orali. Tuttavia, esistono studi in cui l'impiego di metformina è stato associato ad un peggioramento nel rischio di demenza o malattia di Alzheimer in pazienti diabetici di tipo 2 (Imfeld et al., 2012; Moore et al., 2013).

Attualmente queste contraddizioni non sono state completamente superate e si pensa che siano legate alla variabilità del profilo di rischio del paziente in terapia e all'eventuale presenza di processi patologici silenti (Wang et al., 2017).

Uno studio (Kodali et al., 2021) ha valutato gli effetti di una somministrazione di 10 settimane di metformina, su un modello animale, costituito dai topi C57BL6/J. Sono state svolte sia valutazioni relative alle capacità cognitive, sia uno studio autoptico su campioni di tessuto prelevati dal SNC. Il trattamento con metformina ha mostrato di ripristinare significativamente le funzionalità cognitive, migliorando le compromissioni della memoria spaziale, tipiche degli individui di avanzata età. I campioni tissutali prelevati dall'encefalo di topi invecchiati e non trattati mostrano un'anomala *clusterizzazione* delle cellule microgliali, con regressione dell'arborizzazione dendritica, perdita di sinapsi e degenerazione dei terminali assonici. Cellule microgliali caratterizzate da una forte riduzione nel numero di processi cellulari e nelle ramificazioni di questi presentano un fenotipo pro-infiammatorio, noto come M1. Viceversa, campioni prelevati dal gruppo trattato con metformina hanno mostrato una crescente espressione della proteina CD206 (*Cluster of Differentiation 206*), che definisce le cellule microgliali con fenotipo M2 antinfiammatorio. Il fenotipo M2 è caratterizzato da motivi morfologici specifici, tra cui un'amplissima arborizzazione dendritica che copre una vasta area del tessuto nervoso e che mostra processi cellulari di aumentata lunghezza, ricchi di nodi di diramazione e terminazioni. È possibile apprezzare le differenze morfologiche descritte in Figura 49.

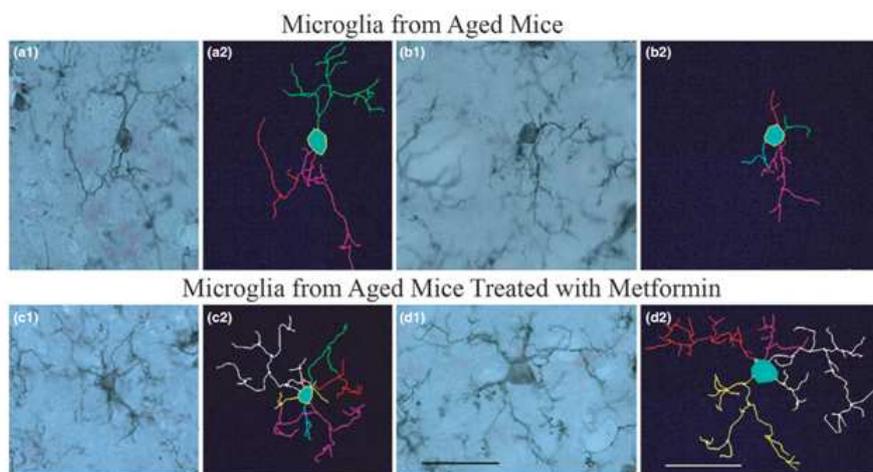


Figura 49: Caratteristiche strutturali delle cellule microgliali prelevate dall'ippocampo di topi di 18 mesi di età in presenza od in assenza di trattamento con metformina (Kodali et al., 2020).

Interessanti differenze si osservano anche a carico degli astrociti, che nel tessuto nervoso di modelli animali di invecchiamento appaiono particolarmente reattivi. La reattività degli astrociti è legata all'espressione della proteina GFAP e alla formazione di processi primari e secondari molto spessi. Il

trattamento con la metformina non riduce la densità di questo tipo cellulare, ma ne limita la reattività: i processi cellulari risultano molto più sottili e più brevi, con una complessiva riduzione dell'area di tessuto nervoso occupata dalle estroflessioni. Nel caso degli astrociti, non si osservano importanti variazioni nel numero di nodi e di terminazioni presenti a livello dei processi cellulari (vedasi Figura 50).

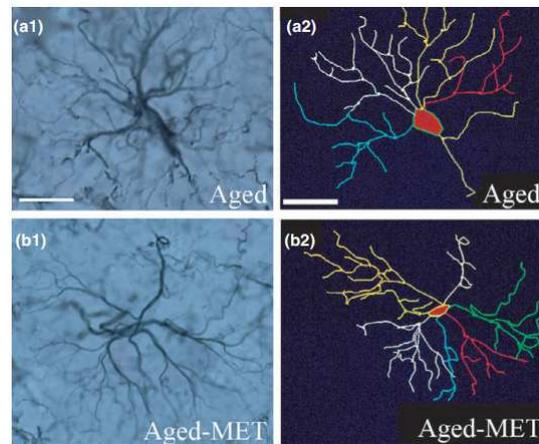


Figura 50: Caratteristiche strutturali degli astrociti prelevati dall'ippocampo di topi di 18 mesi di età in presenza od assenza di trattamento con metformina (Kodali et al., 2020).

La metformina mostra uno spettro di attività antinfiammatorie, che ricadono nella riduzione nei livelli di: $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $MIP-1\alpha$ (*Macrophage Inflammatory Protein-1 α*). È noto in letteratura che queste molecole conducono a compromissioni nella trasmissione sinaptica, nella plasticità e nella funzione della memoria (Lynch, 1998; Ma et al., 2015; Marciniak et al., 2015). È probabile che gli effetti anti-infiammatori della metformina convergano nell'inibizione del fattore di trascrizione NF- κ B. Prevedibilmente, si è osservata una più omogenea distribuzione dei neuroni esprimenti il fattore p-AMPK, la cui percentuale è significativamente aumentata nel gruppo di topi sottoposto a trattamento con metformina ed una maggiore concentrazione della subunità catalitica libera AMPK α . Si osserva una riduzione AMPK-dipendente nell'assemblaggio dei complessi mTORC1 e mTORC2, comprendenti la chinasi intracellulare mTOR. Sono descritti anche meccanismi AMPK-indipendenti di inattivazione della via di mTOR mediati dalla metformina, tra cui l'inibizione di alcuni fattori di crescita (Nair et al., 2013), il blocco della via PI3K/AKT (Slomotiv and Coleman, 2012) e l'inibizione diretta di mTORC1 (Kalender et al., 2010). Queste modificazioni conducono ad un miglioramento nell'autofagia, con aumento della concentrazione dei principali biomarcatori di processo, tra cui: la beclina-1, coinvolta nella formazione e nella maturazione degli autofagosomi, l'ATG5 (*Autophagy protein-5*) coinvolta nella formazione delle vescicole autofagiche e la MAP1-LC3B (*Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta*), il cui ruolo si esplicita nell'elongazione della membrana dell'autofagosoma e nell'interazione con il fattore p62.

Complessivamente, si è osservato un ottimo potenziale terapeutico nell'uso di metformina su modelli

animali di età intermedia, mentre laddove sono stati impiegati modelli in età avanzata i benefici osservati sono minori, probabilmente a causa dell'avanzamento nei processi di neuroinfiammazione e disfunzione neuronale. Un'altra considerazione interessante riguarda le differenze di genere nella risposta al farmaco, legate all'azione dell'estradiolo. Stante l'effetto del testosterone che inibisce la neurogenesi, è possibile sia necessario somministrare dosi più elevate di metformina per osservare un miglioramento nei processi neurogenetici anche nel sesso maschile (Ruddy et al., 2019). La maggiore efficacia della metformina nel sesso femminile è legata anche ad una minore eliminazione renale, a causa della ridotta espressione dei trasportatori per i cationi organici che ne consentono la secrezione attiva, ne consegue una maggiore concentrazione ematica di farmaco ed un potenziamento dell'efficacia (Ma et al., 2016).

4.4 TRATTAMENTO DELLE DISFUNZIONI DELLA BEE

La disfunzione della BEE è un tipico fenomeno che si associa ed è causa di invecchiamento cerebrale, favorendo la penetrazione nel SNC di cellule e molecole ad azione pro-infiammatoria, con esito nello sviluppo di processi neuroinfiammatori. La disfunzione della BEE che accompagna il *brain aging* è dovuta soprattutto alla senescenza delle BMECs (*Brain Microvascular Endothelial Cells*) (Cafueri et al., 2012; Morgan et al., 2013). La sola disfunzione delle BMECs è sufficiente a causare una compromissione della funzionalità della barriera (Jia et al., 2019). Le BMECs senescenti presentano caratteristiche peculiari: acquisizione di una morfologia riconoscibile, allargata ed appiattita, arresto permanente del ciclo cellulare, accorciamento dei margini telomerici dei cromosomi, espressione della SA- β -gal, iper-produzione di ROS ed in particolare di anione superossido, di cui l'enzima NADPH-ossidasi è la maggiore fonte cellulare, acquisizione di un fenotipo SASP con forte rilascio di citochine, chemochine e metalloproteinasi di matrice. Le vie di biosegnalazione più rilevanti nel regolare la senescenza sono: la via di p38MAPK, connessa all'interruzione del ciclo cellulare e la via di NF- κ B, legata alla regolazione nel rilascio di ROS e specie pro-infiammatorie (Iwasa et al., 2003; Pierce et al., 2009).

Diversi composti ad azione senolitica o senomorfa possono essere impiegati per rallentare od impedire lo sviluppo di compromissioni della BEE, ad esempio l'associazione dasatinib-quercetina, con azione senolitica e tre composti ad azione senomorfa: BIRB-796, che agisce sulla chinasi p38MAPK, VAS2870, un inibitore di NADPH ossidasi e QNZ, agente sulla via di NF- κ B (vedasi Figura 51).

Il segno più evidente della senescenza delle BMECs è l'acquisizione di una morfologia appiattita ed allargata, con formazione di spessi filamenti actinici, che attraversano il citoplasma cellulare. Questi fenomeni si osservano, di norma, dopo 19-20 cicli di duplicazione cellulare e sono legati anche all'accumulo citoplasmatico di filamenti di RNA e proteine non degradabili, causato dalla compromissione progressiva dei processi degradativi. I filamenti di actina sono, di norma, prodotti per stabilizzare le giunzioni cellulari e garantire la continuità della barriera, mentre nella senescenza il loro accumulo non è motivato da alcuna esigenza strutturale. Anzi, questi spessi filamenti prodotti in risposta allo stress tendono a trascinare le

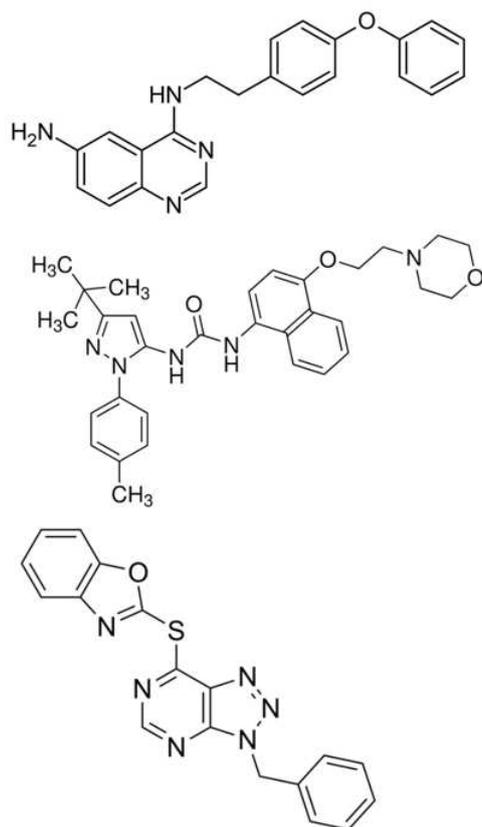


Figura 51: In alto: struttura chimica del candidato farmaco QNZ, inibitore della via di NF- κ B (abcam.com). In centro: struttura chimica del candidato farmaco BIRB-796, inibitore della p38MAPK (sigmaaldrich.com). In basso: struttura chimica del candidato farmaco VAS2870, inibitore dell'enzima NADPH-ossidasi (medchemexpress.com).

proteine giunzionali verso l'interno, favorendo la distruzione dei complessi e la formazione di discontinuità nella struttura della barriera. I mediatori biochimici che sostengono queste modifiche sembrano essere il fattore di trascrizione NF- κ B e la proteina RhoA (*RAS homolog gene family member A*), una *GTP-binding protein* (Allen et al., 2010; Mark et al., 2002). I trattamenti con dasatinib-quercetina, BIRB-796 e VAS2870 sono risultati migliorativi, dimostrando di rallentare i cambiamenti morfologici e l'assemblaggio di fibre di actina, anche se somministrati in uno stadio tardivo di vita dei tessuti studiati, mentre non si è osservato alcun miglioramento utilizzando QNZ. Gli stessi composti hanno dimostrato di ridurre il numero di cellule positive alla SA- β -gal (vedesi Figura 52), mentre la riduzione nell'espressione del fattore istonico γ -H2AX è massima impiegando QNZ e VAS2870 (Ya et al., 2023).

La perdita di capacità proliferativa è tra i principali segni di senescenza; essa è causata dall'attivazione di proteine come il fattore di trascrizione p53 e l'inibitore della chinasi dipendenti da ciclina p21,

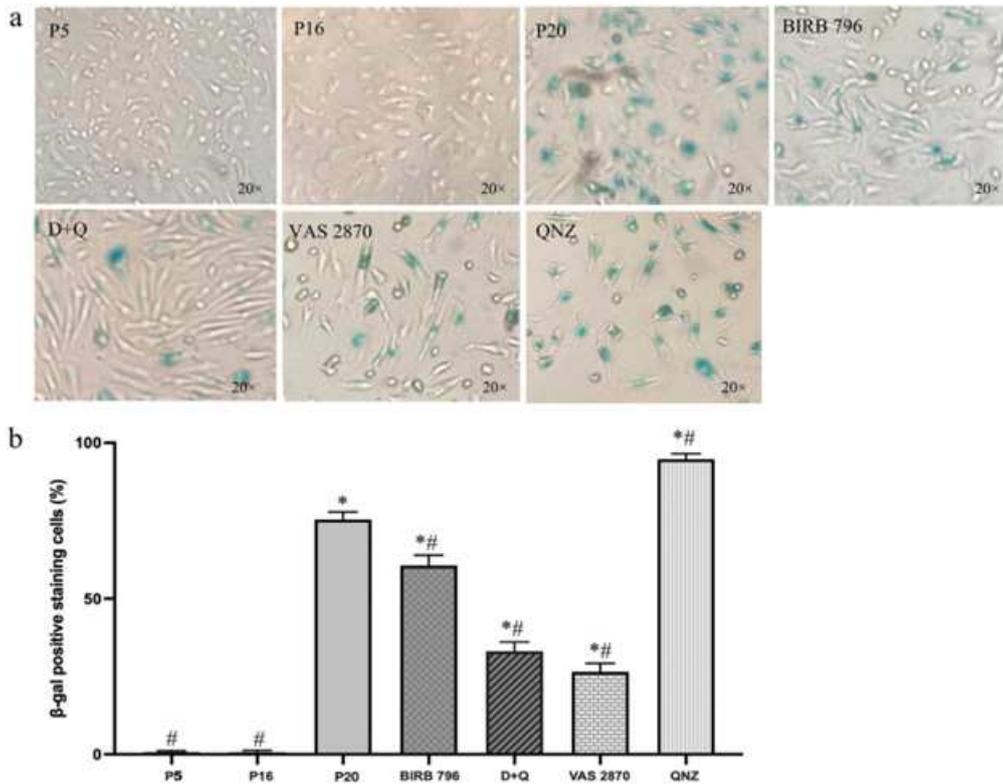


Figura 52: In alto: visualizzazione delle cellule positive alla SA- β -gal in campioni di tessuto dopo 5, 16 e 20 cicli di replicazione, od a seguito di somministrazione di terapia senolitica e senostatica; si denota l'effetto migliorativo dei diversi approcci terapeutici (Ya et al., 2023). In basso: percentuale di cellule positive alla Sa- β -gal sul totale di cellule vitali, si osserva, in particolare, il forte effetto citotossico di QNZ (Ya et al., 2023).

che interrompono il ciclo cellulare nella sotto-fasi G1 od S (Kim et al., 2021). Nessun composto si è dimostrato in grado di ripristinare il rateo di proliferazione misurato nel tessuto giovane, con un risultato particolarmente sfavorevole per QNZ che ha ridotto drasticamente la percentuale di cellule vitali, stimolando eccessivamente l'apoptosi. Allo stesso modo, nessun composto si è dimostrato in grado di diminuire l'accorciamento telomerico tipico delle cellule senescenti, probabilmente perché la perdita irreversibile delle normali estremità cromosomiche è un evento molto precoce, che si completa prima dello sviluppo del fenotipo senescente. VAS2870 ha mostrato un ottimo potenziale anti-ossidante, diminuendo in modo significativo sia l'attività della NADPH-ossidasi, sia il rilascio dell'anione superossido (Ya et al., 2023).

Le alterazioni funzionali che colpiscono le BMECs nella senescenza possono estendersi alle cellule vicine, per effetto spettatore. A livello di BEE, questo fenomeno è particolarmente importante se riguarda le cellule progenitrici endoteliali, responsabili dei processi di rigenerazione dei vasi encefalici e ri-vascolarizzazione del SNC, che possono subire un rallentamento. L'angiogenesi cerebrale dipende dal-

l'assemblaggio di tubi cellulari, di cui il maggior costituente sono le BMECs. Nella senescenza, il numero e la lunghezza di questi tubi cala vistosamente, con conseguente compromissione del processo. Il mediatore biochimico più importante è la chinasi p38MAPK, il cui inibitore BIRB-796 può promuovere significativamente il processo angiogenetico. Un'altra caratteristica delle cellule senescenti è la diminuzione dell'espressione in membrana delle proteine delle *tight junctions*, o la loro collocazione al di fuori della plasmamembrana stessa, che si associa alla riduzione nell'attività dell'enzima telomerasi (Huang et al., 2010). Tra le più importanti componenti delle giunzioni, l'uso di dasatinib-quercetina e BIRB-796 hanno mostrato di ridurre la perdita di ZO-1 (*Zonula Occludens-1*) nelle cellule senescenti, mentre gli effetti su occludina e claudina-5 si sono rivelati minori. L'espressione di occludina e claudina-5 è risultata aumentata, ma senza modificarne i distretti di localizzazione subcellulare (Ya et al., 2023).

4.5 COMPOSTI AGENTI SUL TESSUTO ADIPOSO

L'azione migliorativa sul *brain aging* di alcuni candidati farmaci è legata all'azione combinata su tessuto adiposo e tessuto nervoso, questo vale, in particolare, per i seguenti composti, la cui struttura è riportata in Figura 53:

- Il canagliflozin, un inibitore del trasportatore renale per il glucosio SGLT2 (*Sodium-Glucose co-Transporter 2*), utilizzato nella terapia orale del diabete di tipo 2 per favorire la perdita di glucosio attraverso le urine e ridurre il picco glicemico. Si è osservato che questo farmaco può estendere l'aspettativa di vita nei topi di sesso maschile, con un effetto massimo del 14%, senza alcun effetto sulle femmine (Miller et al., 2020).
- La rapamicina è un inibitore della chinasi intracellulare mTOR, che mostra di estendere l'aspettativa di vita in topi di ambedue i sessi (Miller et al., 2014; 2020). La proteina mTOR è spesso iperattivata nei fenomeni di senescenza, i cui segni distintivi sono dovuti largamente all'assemblaggio del complesso mTORC1 (Weichhart et al., 2018).
- L'acarbosio è un inibitore dell'enzima intestinale α -glucosidasi, deputato alla digestione degli amidi, utilizzato al fine di ridurre il picco post-prandiale di glucosio in soggetti affetti da diabete di tipo 2. Anch'esso si è dimostrato in grado di migliorare l'aspettativa di vita in animali di entrambi i sessi (Harrison et al., 2014), anche se con un effetto più spiccato nei maschi (20%) e minore nelle femmine (5%) (Harrison et al., 2014).
- Il 17- α -estradiolo è un isomero ottico del 17- β -estradiolo, rispetto al quale mostra minore capacità di interazione con il recettore estrogeno (Zhurova et al., 2009). Ha dimostrato di estendere sensibilmente l'aspettativa di vita nel maschio (19%), senza effetti visibili nella femmina (Strong et al., 2016).

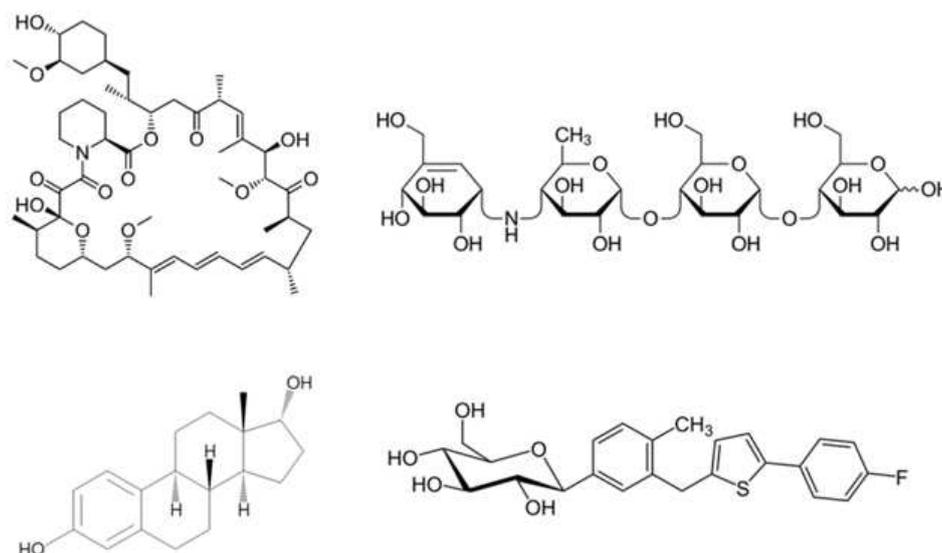


Figura 53: In alto a sinistra: struttura chimica della rapamicina, o sirolimus (Fvanconcellos [d]). In alto a destra: struttura chimica dell'acarbiosio (Vaccinationist). In basso a sinistra: struttura chimica del 17- α -estradiolo (lgcstandards.com). In basso a destra: struttura chimica del canagliflozin (Yikrazuul [b]).

Il meccanismo d'azione di questi composti nel loro normale uso clinico è piuttosto variabile, tuttavia è possibile individuare degli effetti comuni sulla biochimica cellulare, che ne potrebbero caratterizzare l'attività condivisa nei fenomeni di *brain aging*. L'acarbiosio ed il 17- α -estradiolo (solo nel sesso maschile) hanno dimostrato di favorire la traduzione di sequenze di mRNA prive di proteina Cap (Shen et al., 2021) e di ridurre la sovra-stimolazione di alcune chinasi, come ERK1, ERK2, MEK1 (*Mitogen-activated protein kinase kinase*), MNK1 e MNK2 (*MAP kinase-interacting serine/theonine-protein kinase*), che regolano il processo di traduzione agendo sul fattore eIF4A (Wink et al., 2022). Tuttavia, il principale meccanismo d'azione dei composti trattati in questa sezione riguarda l'efficientamento nella risposta insulinica e nel catabolismo di diversi tessuti, cui consegue la riduzione dello stato infiammatorio dell'organismo, con diverse ricadute positive sul benessere dell'encefalo. Una parte importante di questa azione si esprime nell'interazione con il tessuto adiposo, il quale si distingue in tre porzioni di diversa funzione:

- Tessuto adiposo bianco (WAT, *White Adipose Tissue*), con primaria funzione di immagazzinamento delle riserve energetiche.
- Tessuto adiposo bruno (BAT, *Brown Adipose Tissue*), con finalità di produzione di calore. Esso funziona grazie alla proteina disaccoppiante UCP-1 (*UnCoupling Protein 1*), il cui ruolo è dissipare il gradiente elettrochimico prodotto nella catena di trasporto degli elettroni, impedendo l'azione della ATP-sintetasi.

- Tessuto adiposo beige (*Beige/brite Adipose Tissue*), ottenuto per conversione del WAT dietro stimolazione opportuna, ad esempio dopo esposizione al freddo o per attivazione dei recettori adrenengici β_3 .

L'invecchiamento è caratterizzato dall'alterazione nella distribuzione del tessuto adiposo, con aumento delle quantità di WAT e riduzione di quelle di BAT, ridotta espressione di UCP-1 negli adipociti bruni e diminuita capacità di conversione del WAT in tessuto beige (Young et al., 1984). Un aumento nei livelli di UCP-1 potrebbe risultare utile nella prevenzione del *brain aging*, poiché aumentando la quantità e la funzionalità del BAT, che dipende primariamente da UCP-1, è possibile migliorare la sensibilità insulinica e la tolleranza al glucosio, mantenendo l'omeostasi del metabolismo degradativo del SNC e prevenendo fenomeni di insulino-resistenza (Bordicchia et al., 2012; Bostrom et al., 2012). Il miglioramento dello status del tessuto adiposo può avere ricadute sull'infiammazione latente di basso grado, la quale è profondamente legata all'attività dei macrofagi, divisi nei fenotipi M1 ed M2. I macrofagi M1 secernono diverse tipologie di citochine pro-infiammatorie, il marcatore più comune della loro attività è l'iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) (Russo and Lumeng, 2017; Thomas and Apovian, 2017), mentre i macrofagi M2 secernono citochine antinfiammatorie e sono identificati dalla proteina Arg1 (arginasi). La riduzione della popolazione di macrofagi M1 e l'aumento degli M2 diminuisce a sua volta il livello di infiammazione con ricadute positive sulla salute dell'encefalo. Un recente studio (Li et al., 2023) è stato realizzato trattando i topi a partire dai 4 mesi di vita e fino al completamento del primo anno, con i seguenti dosaggi di farmaco:

- Canagliflozin 180 mg/kg
- Rapamicina 14 mg/kg
- Acarbosio 1 g/kg
- 17- α -estradiolo 14.4 mg/kg

I risultati ottenuti sono di seguito elencati:

- Aumentata espressione della proteina UCP-1 negli adipociti bruni in tutti i trattamenti, aumentata espressione di UCP-1 negli adipociti bianchi in modo indipendente dal sesso per l'acarbosio ed in modo più spiccato negli esemplari maschi per 17- α -estradiolo e canagliflozin. Il comportamento della rapamicina risultò anomalo, con riduzione dell'espressione di UCP-1 in ambo i sessi. Si pensa che questa anomalia sia legata ad un affetto secondario tipico della sola rapamicina, indipendente dalla via principale attraverso cui questo farmaco agisce nella prevenzione del *brain aging*.
- Maggiore attività dei macrofagi M2, definita dall'aumentata espressione dell'argininasi negli adipociti bruni e nel WAT perigonadale in modo indipendente dal sesso. Elevazione di Arg1 nel WAT

inguinale in modo sesso-indipendente per acarbosio e rapamicina, in maniera più spiccata nei maschi per 17- α -estradiolo e nei soli maschi per canagliflozin.

- Minore attività dei macrofagi M1, definita dalla ridotta espressione di iNOS nel BAT, nel WAT inguinale e perigonadico per tutti e quattro i trattamenti, in modo più evidente negli animali di sesso maschile nel solo caso del 17- α -estradiolo.
- Alterata concentrazione plasmatica di FNDC5 (*FibroNectin type III Domain Containing protein 5*) ed irisina, un ormone che favorisce la conversione degli adipociti bianchi in bruni e che deriva dal taglio proteolitico di FNDC5 ad opera della PGC1 α . Questi marcatori sono risultati più espressi in tutti i trattamenti, in modo più evidente negli individui maschi per i soli canagliflozin e 17 α -estradiolo. Aumentati livelli di FNDC5 nell'ippocampo di tutti i topi trattati, senza differenze di sesso. Maggiore concentrazione di doublecortina e BDNF, indicanti uno stato di salute del SNC, con parziale specificità maschile solo per BDNF e solo nei trattamenti con canagliflozin e 17 α -estradiolo.

Considerando le caratteristiche delle vie di regolazione su cui i farmaci agiscono, gli effetti elencati in questo paragrafo evidenziano per tutti e quattro i composti un ottimo potenziale neuroprotettivo, da confermare su modello umano.

4.6 DERIVATI DEL FENTIZOLO

Il fentizolo (vedasi Figura 54) è un composto ad azione immuno-soppressiva, che ha mostrato una ridotta tossicità acuta ed un buon potenziale nel contrasto dell'invecchiamento, stante la capacità di prolungare l'aspettativa di vita (Chrienova et al., 2023). Si tratta di un composto che ha una potenziale attività nel trattamento della malattia di Alzheimer, grazie all'effetto sull'enzima ABAD (*Amyloid- β -Binding Alcohol Dehydrogenase*). Il legame tra ABAD e le unità solubili di proteina β -amiloide può distorcere la struttura dell'enzima, bloccando la sua attività citoprotettiva e favorendo il rilascio di specie radicaliche a livello mitocondriale. Il fentizolo può bloccare il legame tra amiloide- β e ABAD, diminuendo l'importanza di questo meccanismo patogenetico (Yan et al., 2005).

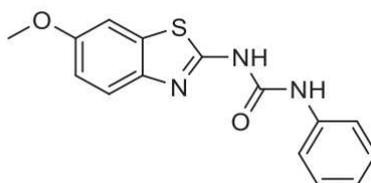


Figura 54: Struttura chimica del fentizolo, una benzimidazol-urea (Chrienova et al., 2023).

Un recente studio (Chrienova et al., 2023) ha preso in analisi 9 derivati del fentizolo, la cui struttura chimica è riportata in Figura 55. Questi composti rappresentano un tentativo di unire, in una sola struttura molecolare, la capacità di interagire positivamente con ABAD, tipica del fentizolo, con l'inibizione di mTOR presso il dominio ove interagisce l'inibitore rapamicina (il *FK506 and rapamycin-binding protein-rapamycin binding domain*), per realizzare un candidato farmaco con azione anti-invecchiamento. I nove composti scelti sono quelli che mostrano una più bassa energia di *binding* di mTOR. Ai test chimico-farmaceutici, tutte le nove molecole sono risultate caratterizzate da *drug-likeness* ed idonee a proseguire con i saggi *in vitro*.

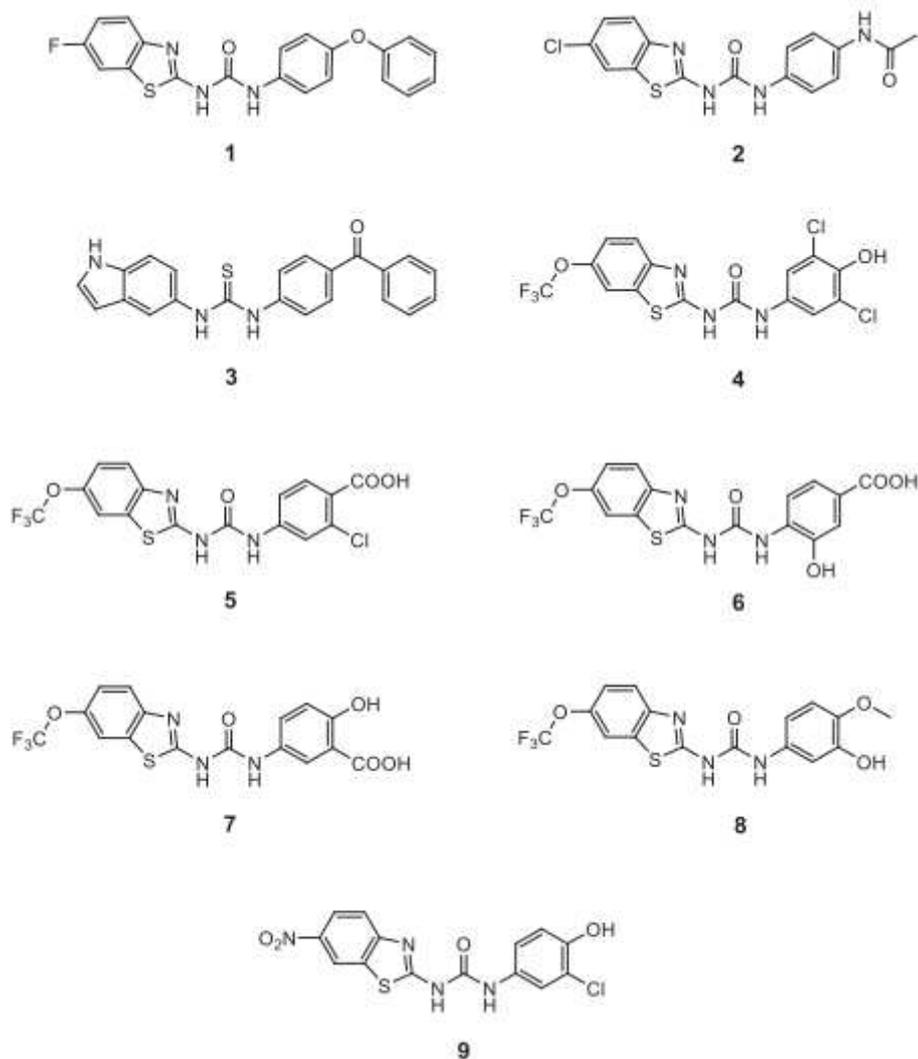


Figura 55: Selezione di alcune molecole derivate dal fentizolo (Chrienova et al., 2023).

La capacità di inibizione di mTOR è stata verificata su fibroblasti prelevati dalla cute umana e quantificata in termini di attività della p70 S6 chinasi, la quale dipende dal complesso mTORC1. I

	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-27	MCP-1	IFN γ	TNF α	IP-10
frentizole			▼					▼		▲	▼
1	▼	▼	▼	▲			▲	▼		▲	
2		▼	▼	▲				▼	▼	▲	▲
3	▼	▼	▼		▲			▼		▲	
4	▼		▼					▼			
5	▼	▼	▼			▼		▼	▼		
6		▼	▼				▼		▼	▲	
7			▼			▼		▼			▼
8			▼	▲		▼		▼			
9			▼			▼		▼			▲

Figura 56: Tabella riassuntiva degli effetti senostatici di ciascun derivato del frentizolo, relativi alla modifica del fenotipo SASP, limitatamente alla produzione di citochine pro-infiammatorie ed antinfiammatorie (Chrienova et al., 2023).

migliori composti sono risultati i candidati 4, 8 e 9. Gli stessi hanno dimostrato di inibire la chinasi mTOR anche su campioni umani di cellule senescenti. La potenziale attività senostatica dei derivati del frentizolo è stata testata in termini di inibizione del fenotipo SASP, ottenendo risultati variabili (vedasi Figura 56). Tra gli effetti più rilevanti è possibile citare la riduzione nel rilascio di IL-6, coinvolta nella modulazione della risposta infiammatoria (Johnson et al., 2018) e la forte *down*-regolazione di MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*, anche nota come CCL2, cioè ligando della chemochina 2), che regola la migrazione e l'infiltrazione di monociti e macrofagi (Wang et al., 2022). Un altro mediatore di interesse, la cui concentrazione risulta diminuita, è l'IL-12p70, coinvolta nella risposta immunitaria innata ed adattativa (Epelbaum et al., 1991).

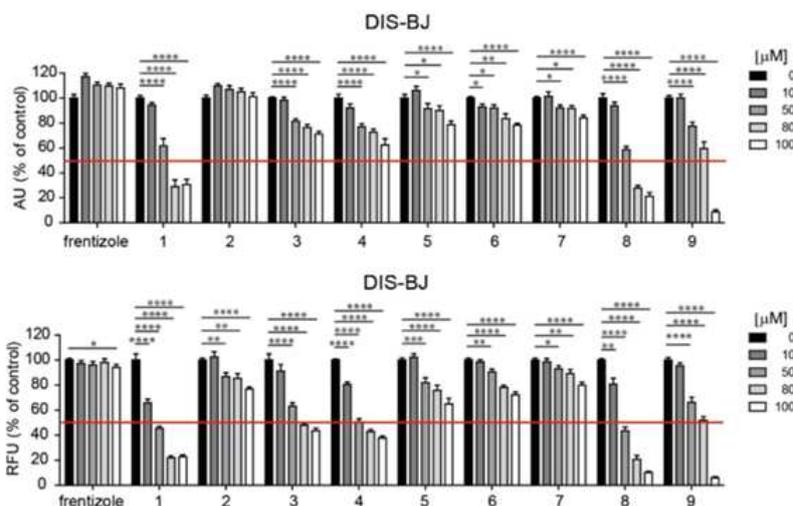


Figura 57: Effetto senolitico dei derivati del frentizolo, espresso su fibroblasti umani BJ in cui la senescenza è stata indotta somministrando docetaxel, un antitumorale. La serie superiore di campioni è stata colorata con cristal-violetto, mentre quella inferiore con resazurina (Chrienova et al., 2023).

I migliori risultati si sono osservati per i candidati farmaci 4, 8 e 9. Il fentizolo non ha alcun effetto anti-proliferativo, mentre quasi tutti i suoi derivati lo mostrano *in vitro* (vedasi Figura 57); i dati più evidenti riguardano i candidati farmaci 1, 3, 4, 8 e 9. Dunque, questi derivati mostrano anche un effetto senolitico, con tossicità verso le cellule senescenti di tipo aspecifico per alcuni, ad esempio il candidato farmaco 8, che mostra l'effetto più visibile e di tipo specifico per altri, tra cui i candidati 1 e 9, che lo mostrano solo in alcune tipologie cellulari ed in alcuni tipi di senescenza.

La fase di indagine preclinica ha condotto alla selezione dei candidati farmaci 4, 8 e 9, il cui profilo complessivo è migliore, vantando sia un effetto senostatico, sia un effetto senolitico. Gli stessi sono stati sottoposti a semplici valutazioni su modello animale, in particolare sono stati misurati la tossicità acuta ed il profilo farmacocinetico, le cui curve ematiche e centrali sono riportate in Figura 58. I primi effetti avversi sono stati rilevati per le dosi intermedie, dopo 2 ore dall'esposizione, comprendendo: dolore muscolare, indolenzimento, debolezza e tremori, la loro severità è risultata dose-dipendente e la DL_{50} è stata stimata in 559 mg/kg nel sesso femminile e 575 mg/kg nel sesso maschile. Il profilo farmacocinetico più favorevole si è osservato per il candidato farmaco 4, unico a mostrare una sensibile penetrazione a livello centrale, con concentrazioni dipendenti da quelle plasmatiche. Questi primi dati *in vivo* suggeriscono che il composto 4 abbia le caratteristiche per proseguirne lo sviluppo come candidato farmaco.

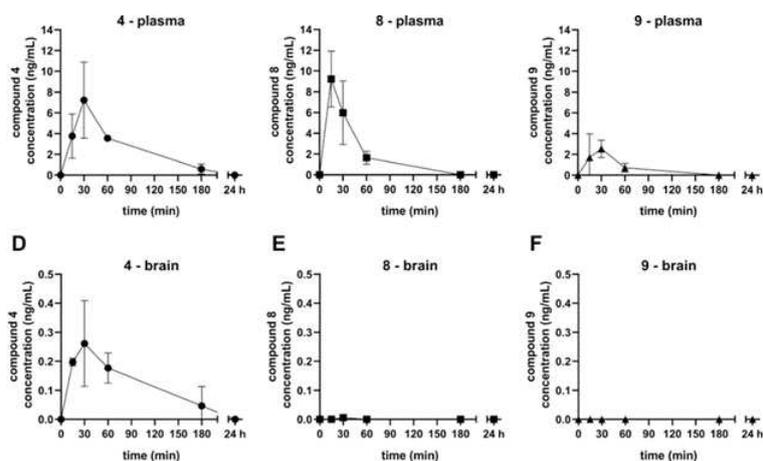


Figura 58: Curve farmacocinetiche dei derivati del fentizolo 4, 8 e 9, misurate nel plasma ematico e nel parenchima encefalico; il solo derivato 4 ha mostrato un'apprezzabile capacità di penetrazione nel SNC (Chrienova et al., 2023).

4.7 RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE IPOTALAMICA

Uno studio (Sadagurski et al., 2017) ha valutato il potenziale effetto farmacologico di tre composti che sembrano ridurre il livello infiammatorio dell'ipotalamo: l'acarbiosio, il 17- α -estradiolo e l'acido nor-diidroguaiaretico (NDGA). L'NDGA (vedasi Figura 59) è un lignano, con azione di potente anti-ossidante

ed inibitore delle lipossigenasi (Lu et al., 2010), da cui deriva una spiccata attività antinfiammatoria (Ferrandiz and Alcaraz, 1991).

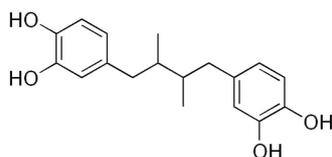


Figura 59: Struttura chimica dell'acido nor-diidroguaiaretico (Edgar [c]).

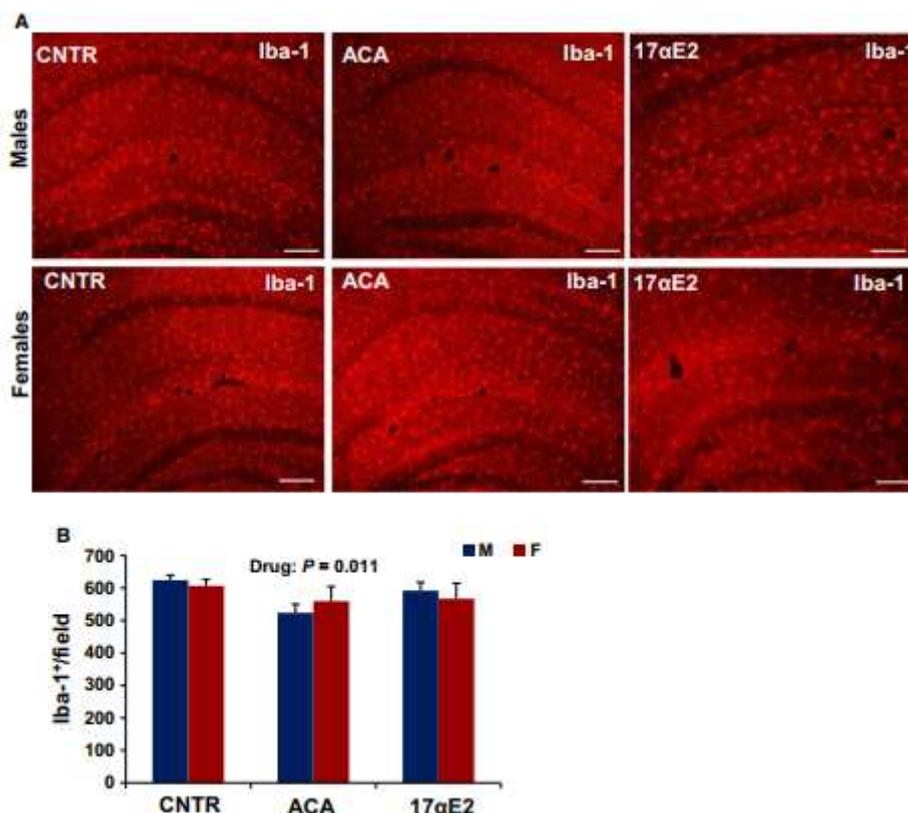


Figura 60: In alto: campioni di tessuto ippocampale prelevati da topi non trattati (CNTR), oppure dopo somministrazione di acarbiosio (ACA) o 17 α -estradiolo (17- α E2) (Sadagurski et al., 2017). Le cellule della microglia sono evidenziate con metodo di immunofluorescenza impiegando il marcatore Iba-1 (*Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*). In basso: differenze di genere nella risposta farmacologica delle cellule microgliali dell'ippocampo (Sadagurski et al., 2017).

Alcuni processi di regolazione dell'espressione genica e modificazione della composizione cellulare del tessuto nervoso durante la *brain aging* mostrano caratteristiche di dimorfismo sessuale (Berchtold et al., 2008). Le differenze più significative riguardano l'attivazione della microglia, il numero e la differenziazione degli astrociti e l'espressione genica di alcune citochine. Allo stesso modo, è stato evidenziato

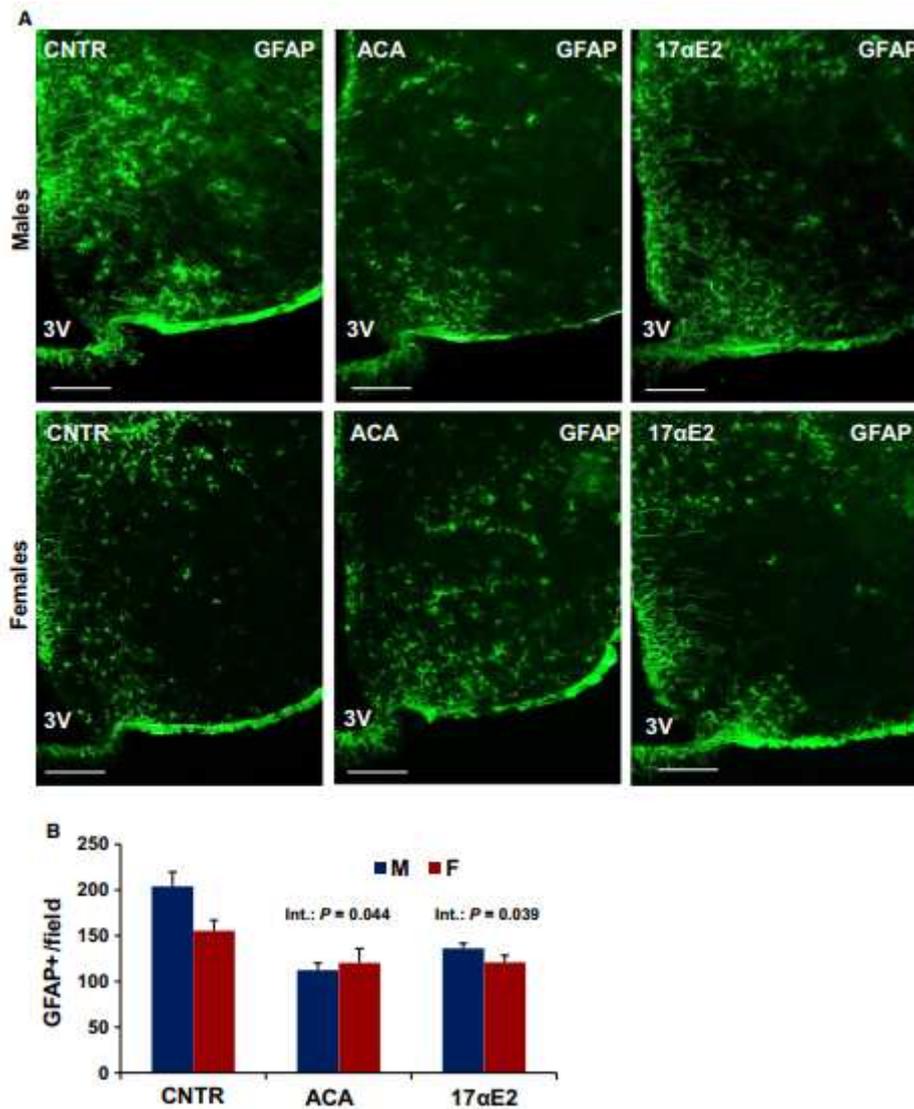


Figura 61: In alto: campioni di tessuto ipotalamico prelevati da topi non trattati (CNTR), oppure dopo somministrazione di acarbiosio (ACA) o 17- α -estradiolo (17 α E2) (Sadagurski et al., 2017). Gli astrociti sono evidenziati con metodo di immunofluorescenza impiegando il marcatore GFAP. In basso: differenze di genere nella risposta farmacologica degli astrociti dell'ipotalamo (Sadagurski et al., 2017).

precedentemente un certo dimorfismo sessuale nel meccanismo d'azione di acarbiosio e 17- α -estradiolo: molti effetti di questi farmaci nel trattamento del *brain aging* sono più spiccati (nel caso dell'acarbiosio) o riguardano esclusivamente (nel caso del 17- α -estradiolo) il sesso maschile. Anche l'effetto di prolungamento sull'aspettativa di vita di NDGA risulta visibile nei soli modelli animali di sesso maschile (Strong et al., 2008; Harrison et al., 2013). È possibile che il dimorfismo sessuale che si osserva nell'attività farmacologica di questi composti sia dovuto alle differenze ormonali che sussistono tra maschio e femmina,

come accade per la plasticità neuronale e gliale, che sono sensibili agli ormoni estrogeni (Zagni et al., 2016). Inoltre, gli steroidi sessuali sono regolatori della trascrizione genica e, come tali, agiscono sulle citochine mediatrici della risposta immunitaria e dei processi infiammatori (Barna et al., 1996). I risultati dello studio (Sadagurski et al., 2017) sono stati i seguenti:

- L'acarbossio ha mostrato di ridurre le cellule microgliali attivate sia presso l'ippocampo (vedasi Figura 60) , sia presso l'ipotalamo. Nell'ipotalamo l'effetto è risultato maggiore nel sesso maschile, mentre nell'ippocampo non si è osservata alcuna specificità legata al sesso. La contemporanea riduzione nei livelli ipotalamici di TNF- α negli individui di sesso maschile suggerisce un miglioramento nell'infiammazione in questo distretto.
- Il 17- α -estradiolo ha mostrato un effetto simile all'acarbossio sulla microglia e sulla concentrazione di TNF- α nel distretto ipotalamico (vedasi Figura 60), con una riduzione significativa e più evidente nel sesso maschile.
- Sia l'acarbossio che il 17- α -estradiolo hanno mostrato di ridurre l'astrogliosi presso l'ipotalamo (vedasi Figura 61), diminuendo i livelli di GFAP in modo molto più evidente negli esemplari maschi rispetto alle femmine.
- Il trattamento con NDGA ha mostrato di ridurre significativamente il numero di astrociti e cellule microgliali presso l'ipotalamo, senza raggiungere la significatività statistica sul piano del dimorfismo sessuale. La riduzione nella concentrazione di TNF- α a livello ipotalamico è risultata significativa e più evidente nei maschi.

5 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Obiettivo iniziale di questo elaborato di Tesi era organizzare in un testo unico le informazioni disponibili in letteratura sul fenomeno del *brain aging*, per fornirne una descrizione coerente e completa. Questo ha permesso di evidenziare quei processi patologici e patogenetici che contraddistinguono l'invecchiamento dell'encefalo, definendo i target su cui intervenire con finalità preventiva o curativa, attraverso l'uso di farmaci, integratori o alimenti funzionali. Di ciascuno dei prodotti analizzati sono state raccolte le più significative evidenze di efficacia disponibili. Il risultato è un'ampia revisione di letteratura che ha permesso di proporre una selezione dei prodotti più utili nei fenomeni di invecchiamento, siano essi già disponibili sul mercato, oppure in via di sviluppo.

Nella prima parte dell'elaborato è stata fornita una descrizione completa dei cambiamenti, strutturali e funzionali, che colpiscono l'encefalo nella terza età, partendo dalle modificazioni macroscopiche a livello di anatomia dell'organo, passando per le alterazioni delle microstrutture dei tessuti del SNC, fino ad arrivare ai singoli processi cellulari e molecolari che si scoprono alterati nei modelli di invecchiamento. La comparsa di questi cambiamenti si associa al declino delle capacità cognitive della persona e può favorire il futuro sviluppo di patologie degenerative. In seguito, sono state approfondite le basi genetiche ed epigenetiche dei processi di invecchiamento ed il ruolo di talune anomalie osservate a carico del metabolismo energetico neuronale e della dinamica mitocondriale. Infine, è stata esaminata la correlazione tra il *brain aging* ed il processo di senescenza che può colpire le diverse componenti cellulari dell'encefalo, nonché il legame tra la fisiologia del SNC e quella del distretto intestinale, il cui *trait d'union* si individua nella modulazione del sistema immunitario e del livello di infiammazione basale. Nella seconda parte della Tesi sono stati presi in considerazione gli integratori alimentari, una famiglia di prodotti che contengono ben standardizzate sostanze per cui è descritto un ruolo migliorativo sulla fisiologia dell'individuo o sul benessere di alcuni distretti anatomici. Tra le famiglie di sostanze che hanno dimostrato un interessante profilo di efficacia è possibile citare gli acidi grassi omega-3 a lunga catena, gli antiossidanti, la spermidina ed i probiotici. La classe degli antiossidanti è stata presa in particolare considerazione, evidenziando sia gli effetti di sostanze "classiche", come vitamina C ed N-acetilcisteina, sia di una serie di derivati vegetali polifenoli, con particolare attenzione per il resveratrolo ed i composti della famiglia delle antocianine. La terza parte della Tesi è stata dedicata agli alimenti funzionali, componenti della regolare dieta umana, che, oltre ad essere fonte di nutrienti di diverse categorie, apportano sostanze, per le quali è definito un ruolo biologico favorevole. Inizialmente è stato analizzato il ruolo di nutrienti trasversali, comuni in tutte le tipologie di dieta, tra cui alcuni lipidi, amminoacidi e vitamine. In seguito si è provveduto ad analizzare una serie di alimenti di origine vegetale, tra cui fragole, mirtilli, altre bacche ed agrumi, ricchi di sostanze ad azione antiossidante, ma anche bevande, come tè, caffè, e vino, curcuma e diverse categorie di spezie. Alla fine è stato inserito un *focus* su alcune piante di provenienza orientale, che stanno entrando a far

parte o potranno rientrare in futuro anche nella dieta occidentale, ad esempio *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba* e *Acer truncatum*. La quarta e ultima parte è stata incentrata sui farmaci attualmente in sperimentazione per il trattamento dei fenomeni di *brain aging* e su quelli approvati in terapia, che potrebbero essere impiegati *off-label* per migliorare la gestione dell'invecchiamento. Tra le categorie di farmaci prese in analisi, è possibile citare alcune molecole in sperimentazione per il trattamento della malattia di Alzheimer (J147, CMS121 e CAD31), nonché il vasto gruppo di farmaci ad azione senolitica o senostatica. La via della senescenza cellulare è emersa come un target di particolare rilevanza nelle senoterapie, che possono mirare ad eliminare per apoptosi le cellule senescenti, oppure a bloccarne le caratteristiche più dannose. Tra i farmaci senolitici, una trattazione più ampia è stata riservata ai due trattamenti per cui sono disponibili più forti evidenze di efficacia, il navitoclax e l'associazione dasatinib-quercetina. Tra i senostatici, maggiore attenzione è stata riservata alla metformina, che mostra un interessante profilo di efficacia ed una ridotta tossicità. Sono stati esaminati i ruoli di alcuni farmaci che contrastano i fenomeni di invecchiamento, agendo sull'omeostasi del tessuto lipidico e sulla normalizzazione del metabolismo energetico, in particolare rapamicina, 17- α -estradiolo, acarbosio, canagliflozin ed acido nor-diidroguaiaretico, il cui meccanismo d'azione appare caratterizzato da un certo dimorfismo sessuale, anch'esso oggetto di approfondimento. Infine, è stato analizzato uno studio di prospettiva più ampia, che ha valutato da un punto di vista chimico-farmaceutico e pre-clinico alcune derivati del fentizolo, individuando un potenziale nuovo farmaco con azione senolitica e senostatica.

Questo elaborato di Tesi si inserisce in un ambito di ricerca in attivo sviluppo e di grande interesse. La speranza è che, attraverso lavori come questo, l'approfondimento dei processi e dei meccanismi descritti esiti nel perfezionamento dei trattamenti oggi noti o nella messa a punto di approcci nuovi ed innovativi, che possano migliorare in modo percettibile la gestione delle problematiche di salute tipiche della tarda età, permettendo di garantire alla popolazione colpita da queste affezioni, non solo una vita più lunga, ma anche una qualità di vita sensibilmente migliore.

BIBLIOGRAFIA

AN, M. "TOM STRACHAN AND ANDREW READ."

Aron, Liviu, Joseph Zullo, and Bruce A. Yankner. "The adaptive aging brain." *Current opinion in neurobiology* 72 (2022): 91-100.

Arumugam, Thiruma V., et al. "Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.35 (2007): 14104-14109.

Barja, Gustavo. "Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 31 (1999): 347-366.

Barter, Jolie D., and Thomas C. Foster. "Aging in the brain: new roles of epigenetics in cognitive decline." *The Neuroscientist* 24.5 (2018): 516-525.

Beilharz, Jessica E., Jayanthi Maniam, and Margaret J. Morris. "Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats." *Brain, behavior, and immunity* 37 (2014): 134-141.

Berchtold, Nicole C., et al. "Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.40 (2008): 15605-15610.

Berchtold, Nicole C., et al. "Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease." *Neurobiology of aging* 34.6 (2013): 1653-1661.

Bielak-Zmijewska, Anna, Grazyna Mosieniak, and Ewa Sikora. "Is DNA damage indispensable for stress-induced senescence?." *Mechanisms of ageing and development* 170 (2018): 13-21.

Blinkouskaya, Yana, et al. "Brain aging mechanisms with mechanical manifestations." *Mechanisms of ageing and development* 200 (2021): 111575.

Bloss, Erik B., et al. "Evidence for reduced experience-dependent dendritic spine plasticity in the aging prefrontal cortex." *Journal of Neuroscience* 31.21 (2011): 7831-7839.

Boespflug, Erin L., et al. "Enhanced neural activation with blueberry supplementation in mild cognitive impairment." *Nutritional neuroscience* 21.4 (2018): 297-305.

Boisvert, Matthew M., et al. "The aging astrocyte transcriptome from multiple regions of the mouse brain." *Cell reports* 22.1 (2018): 269-285.

Booth, Lauren N., and Anne Brunet. "The aging epigenome." *Molecular cell* 62.5 (2016): 728-744.

Borrás, Consuelo, et al. "Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males." *Free radical biology and medicine* 34.5 (2003): 546-552.

Borrás, Consuelo, et al. "Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1802.1 (2010): 205-211.

Bors, Luca, et al. "Age-dependent changes at the blood-brain barrier. A Comparative structural and functional study in young adult and middle aged rats." *Brain research bulletin* 139 (2018): 269-277.

Boumezbeur, Fawzi, et al. "Altered brain mitochondrial metabolism in healthy aging as assessed by in vivo magnetic resonance spectroscopy." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30.1 (2010): 211-221.

Bowling, Allen C., et al. "Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain." *Journal of neurochemistry* 60.5 (1993): 1964-1967.

Buffolo, Federica, et al. "Neuroinflammation induces synaptic scaling through IL-1 β -mediated activation of the transcriptional repressor REST/NRSF." *Cell death & disease* 12.2 (2021): 180.

Buscemi, Giacomo, et al. "Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks." *Oncogene* 23.46 (2004): 7691-7700.

Campello, Silvia, and Luca Scorrano. "Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology." *EMBO reports* 11.9 (2010): 678-684.

Cao, Bo, et al. "Lifespan gyrfication trajectories of human brain in healthy individuals and patients with major psychiatric disorders." *Scientific Reports* 7.1 (2017): 511.

Cappell, Katherine A., Leon Gmeindl, and Patricia A. Reuter-Lorenz. "Age differences in prefrontal recruitment during verbal working memory maintenance depend on memory load." *Cortex* 46.4 (2010): 462-473.

Cardinaux, Jean-René, Igor Allaman, and Pierre J. Magistretti. "Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBP β and C/EBP δ in astrocytes." *Glia* 29.1 (2000): 91-97.

Caruso, Donatella, et al. "Age-related changes in neuroactive steroid levels in 3xTg-AD mice." *Neurobiology of aging* 34.4 (2013): 1080-1089.

Chang, Yu-Ming, et al. "Increased action potential firing rates of layer 2/3 pyramidal cells in the prefrontal cortex are significantly related to cognitive performance in aged monkeys." *Cerebral Cortex* 15.4 (2005): 409-418.

Cheng, Aiwu, et al. "Telomere protection mechanisms change during neurogenesis and neuronal maturation: newly generated neurons are hypersensitive to telomere and DNA damage." *Journal of Neuroscience* 27.14 (2007): 3722-3733.

Cheng, Hao, et al. "Repression of human and mouse brain inflammaging transcriptome by broad genome-wide histone hyperacetylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.29 (2018): 7611-7616.

Cheng, Zhiyong, Yolanda Tseng, and Morris F. White. "Insulin signaling meets mitochondria in metabolism." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21.10 (2010): 589-598.

Chrienova, Zofia, et al. "Frentizole derivatives with mTOR inhibiting and senomorphic properties." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 167 (2023): 115600.

- Clarke, Laura E., et al. "Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.8 (2018): E1896-E1905.
- Cohen, Justin, and Claudio Torres. "Astrocyte senescence: evidence and significance." *Aging cell* 18.3 (2019): e12937.
- Cohen, Samuel M., et al. "Evolutionary and functional perspectives on signaling from neuronal surface to nucleus." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460.1 (2015): 88-99.
- Collett, Gavin P., et al. "Endoplasmic reticulum stress stimulates the release of extracellular vesicles carrying danger-associated molecular pattern (DAMP) molecules." *Oncotarget* 9.6 (2018): 6707.
- Cornejo, Francisca, and Rommy von Bernhardi. "Age-dependent changes in the activation and regulation of microglia." *Glial Cells in Health and Disease of the CNS* (2016): 205-226.
- Coupé, Pierrick, et al. "Lifespan changes of the human brain in Alzheimer's disease." *Scientific reports* 9.1 (2019): 3998.
- Cox, Andrew G., et al. "Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins." *Biochemical Journal* 421.1 (2009): 51-58.
- Cribbs, David H., et al. "Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study." *Journal of neuroinflammation* 9 (2012): 1-18.
- Cunnane, Stephen, et al. "Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease." *Nutrition* 27.1 (2011): 3-20.
- Cunnane, Stephen C., et al. "Can ketones help rescue brain fuel supply in later life? Implications for cognitive health during aging and the treatment of Alzheimer's disease." *Frontiers in molecular neuroscience* 9 (2016): 198347.
- Cutler, Roy G., et al. "Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.7 (2004): 2070-2075.
- Dabkowski, Erinne R., Courtney L. Williamson, and John M. Hollander. "Mitochondria-specific transgenic overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) attenuates ischemia/reperfusion-associated cardiac dysfunction." *Free Radical Biology and Medicine* 45.6 (2008): 855-865.
- Damani, Mausam R., et al. "Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia." *Aging cell* 10.2 (2011): 263-276.
- Daselaar, Sander M., et al. "Effects of healthy aging on hippocampal and rhinal memory functions: an event-related fMRI study." *Cerebral cortex* 16.12 (2006): 1771-1782.
- Davalos, Albert R., et al. "Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression." *Cancer and Metastasis Reviews* 29 (2010): 273-283.

DeCarli, Charles, et al. "Measures of brain morphology and infarction in the framingham heart study: establishing what is normal." *Neurobiology of aging* 26.4 (2005): 491-510.

De Felice, Fernanda G., and Sergio T. Ferreira. "Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease." *Diabetes* 63.7 (2014): 2262-2272.

De Sampaio e Spohr, Tânia Cristina Leite, et al. "Neuro–glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor- β 1." *European Journal of Neuroscience* 16.11 (2002): 2059-2069.

Denis, Isabelle, et al. "Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: body of evidence and possible mechanisms." *Ageing research reviews* 12.2 (2013): 579-594.

Dimri, Goberdhan P., et al. "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92.20 (1995): 9363-9367.

Dines, Monica, and Raphael Lamprecht. "The role of Ephs and Ephrins in memory formation." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 19.4 (2016): pyv106.

Eitan, Erez, et al. "Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release." *Ageing research reviews* 32 (2016): 65-74.

Elchebly, Mounib, et al. "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene." *Science* 283.5407 (1999): 1544-1548.

Emir, Uzay E., et al. "Noninvasive quantification of ascorbate and glutathione concentration in the elderly human brain." *NMR in Biomedicine* 24.7 (2011): 888-894.

Erdő, Franciska, László Denes, and Elizabeth de Lange. "Age-associated physiological and pathological changes at the blood–brain barrier: A review." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37.1 (2017): 4-24.

Fang, Evandro F., et al. "NAD⁺ in aging: molecular mechanisms and translational implications." *Trends in molecular medicine* 23.10 (2017): 899-916.

Fatokun, Amos A., Valina L. Dawson, and Ted M. Dawson. "Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities." *British journal of pharmacology* 171.8 (2014): 2000-2016.

Fazekas, Franz, et al. "MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging." *American journal of roentgenology* 149.2 (1987): 351-356.

Fazekas, Franz, Reinhold Schmidt, and Philip Scheltens. "Pathophysiologic mechanisms in the development of age-related white matter changes of the brain." *Dementia and geriatric cognitive disorders* 9.Suppl. 1 (1998): 2-5.

Fernando, Malee S., et al. "White matter lesions in an unselected cohort of the elderly: molecular pathology suggests origin from chronic hypoperfusion injury." *Stroke* 37.6 (2006): 1391-1398.

Fielder, Edward, et al. "Short senolytic or senostatic interventions rescue progression of radiation-induced frailty and premature ageing in mice." *Elife* 11 (2022): e75492.

- Fitzhugh, Megan C., et al. "Age-related atrophy and compensatory neural networks in reading comprehension." *Journal of the International Neuropsychological Society* 25.6 (2019): 569-582.
- Franceschi, Claudio, et al. "Inflammaging and 'Garb-aging'." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 28.3 (2017): 199-212.
- Freitas, Hércules Rezende, et al. "Fatty acids, antioxidants and physical activity in brain aging." *Nutrients* 9.11 (2017): 1263.
- Friedman, Jonathan R., and Jodi Nunnari. "Mitochondrial form and function." *Nature* 505.7483 (2014): 335-343.
- Furukawa, Yoshiko, et al. "Isolation and characterization of neuroprotective components from citrus peel and their application as functional food." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 69.1 (2021): 2-10.
- Galatro, Thais F., et al. "Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes." *Nature neuroscience* 20.8 (2017): 1162-1171.
- Gant, John C., et al. "Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release." *Journal of Neuroscience* 26.13 (2006): 3482-3490.
- Gasparoni, Gilles, et al. "DNA methylation analysis on purified neurons and glia dissects age and Alzheimer's disease-specific changes in the human cortex." *Epigenetics & chromatin* 11 (2018): 1-19.
- Gautam, Jyoti, Yu Cao, and Yao Yao. "Pericytic laminin maintains blood-brain barrier integrity in an age-dependent manner." *Translational stroke research* 11.2 (2020): 228-242.
- Geng, Yi-Qun, et al. "Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons." *Biochemical and biophysical research communications* 396.4 (2010): 866-869.
- Geraci, Stefano. *Processo di funzionalizzazione e risposta biologica della lega Ti6Al4V funzionalizzata con polifenoli naturali= Process of functionalization and biological response of Ti6Al4V alloy grafted with natural polyphenols*. Diss. Politecnico di Torino, 2018.
- Ghosh, Debolina, Kelsey R. Levault, and Gregory J. Brewer. "Relative importance of redox buffers GSH and NAD (P) H in age-related neurodegeneration and Alzheimer disease-like mouse neurons." *Aging cell* 13.4 (2014): 631-640.
- Gómez-Sintes, Raquel, María Dolores Ledesma, and Patricia Boya. "Lysosomal cell death mechanisms in aging." *Ageing research reviews* 32 (2016): 150-168.
- Gorgoulis, Vassilis, et al. "Cellular senescence: defining a path forward." *Cell* 179.4 (2019): 813-827.
- Grabowska, Wioleta, Ewa Sikora, and Anna Bielak-Zmijewska. "Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process." *Biogerontology* 18 (2017): 447-476.
- Griffanti, Ludovica, et al. "Classification and characterization of periventricular and deep white matter hyperintensities on MRI: a study in older adults." *Neuroimage* 170 (2018): 174-181.
- Grimm, Amandine, and Anne Eckert. "Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view." *Journal of neurochemistry* 143.4 (2017): 418-431.

- Groh, Nicole, et al. "Age-dependent protein aggregation initiates amyloid- η aggregation." *Frontiers in aging neuroscience* 9 (2017): 138.
- Guix, F. X., et al. "The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain." *Progress in neurobiology* 76.2 (2005): 126-152.
- Gunning-Dixon, Faith M., et al. "Aging of cerebral white matter: a review of MRI findings." *International Journal of Geriatric Psychiatry: A journal of the psychiatry of late life and allied sciences* 24.2 (2009): 109-117.
- Haarmann, Axel, et al. "Human brain endothelial CXCR2 is inflammation-inducible and mediates CXCL5-and CXCL8-triggered paraendothelial barrier breakdown." *International journal of molecular sciences* 20.3 (2019): 602.
- Habes, Mohamad, et al. "White matter hyperintensities and imaging patterns of brain ageing in the general population." *Brain* 139.4 (2016): 1164-1179.
- Halle, Annett, et al. "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β ." *Nature immunology* 9.8 (2008): 857-865.
- Halliwell, Barry. "Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment." *Drugs & aging* 18 (2001): 685-716.
- Hariri, Niloofar, and Louise Thibault. "High-fat diet-induced obesity in animal models." *Nutrition research reviews* 23.2 (2010): 270-299.
- Harley, Calvin B., et al. "The telomere hypothesis of cellular aging." *Experimental gerontology* 27.4 (1992): 375-382.
- Harman, María F., and Mauricio G. Martín. "Epigenetic mechanisms related to cognitive decline during aging." *Journal of neuroscience research* 98.2 (2020): 234-246.
- Hedman, Anna M., et al. "Human brain changes across the life span: a review of 56 longitudinal magnetic resonance imaging studies." *Human brain mapping* 33.8 (2012): 1987-2002.
- Heise, Kirstin-F., et al. "The aging motor system as a model for plastic changes of GABA-mediated intracortical inhibition and their behavioral relevance." *Journal of Neuroscience* 33.21 (2013): 9039-9049.
- Henneman, W. J. P., et al. "Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease: added value over whole brain volume measures." *Neurology* 72.11 (2009): 999-1007.
- Herranz, Nicolás, and Jesús Gil. "Mechanisms and functions of cellular senescence." *The Journal of clinical investigation* 128.4 (2018): 1238-1246.
- Higgins-Chen, Albert T., Kyra L. Thrush, and Morgan E. Levine. "Aging biomarkers and the brain." *Seminars in cell & developmental biology*. Vol. 116. Academic Press, 2021.
- Hodgson, Karen, et al. "Epigenetic age acceleration assessed with human white-matter images." *Journal of Neuroscience* 37.18 (2017): 4735-4743.

Hoek, Jan B., and J. Rydström. "Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase." *Biochemical Journal* 254.1 (1988): 1-10.

Hong, Soyong, et al. "Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models." *Science* 352.6286 (2016): 712-716.

Hong, Sam, et al. "Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis." *The Journal of clinical investigation* 127.8 (2017): 3136-3151.

Hornung, Veit, et al. "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization." *Nature immunology* 9.8 (2008): 847-856.

Howes, Melanie-Jayne R., et al. "Role of phytochemicals as nutraceuticals for cognitive functions affected in ageing." *British journal of pharmacology* 177.6 (2020): 1294-1315.

Hwang, Jee-Yeon, and R. Suzanne Zukin. "REST, a master transcriptional regulator in neurodegenerative disease." *Current opinion in neurobiology* 48 (2018): 193-200.

Hyder, Fahmeed, et al. "Neuronal–glial glucose oxidation and glutamatergic–GABAergic function." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26.7 (2006): 865-877.

Ikematsu, Naoko, et al. "Phosphorylation of the voltage-gated potassium channel Kv2. 1 by AMP-activated protein kinase regulates membrane excitability." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.44 (2011): 18132-18137.

Ionescu-Tucker, Andra, and Carl W. Cotman. "Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease." *Neurobiology of aging* 107 (2021): 86-95.

Ishikawa, Shoma, and Fuyuki Ishikawa. "Proteostasis failure and cellular senescence in long-term cultured postmitotic rat neurons." *Aging Cell* 19.1 (2020): e13071.

Iwakami, Satoshi, et al. "Concentration-dependent dual effects of hydrogen peroxide on insulin signal transduction in H4IIEC hepatocytes." *PloS one* 6.11 (2011): e27401.

Jacobs, Bob, Lori Driscoll, and Matthew Schall. "Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: a quantitative Golgi study." *Journal of comparative neurology* 386.4 (1997): 661-680.

Jiang, Tianyi, et al. "Lipoic acid restores age-associated impairment of brain energy metabolism through the modulation of Akt/JNK signaling and PGC 1 α transcriptional pathway." *Aging cell* 12.6 (2013): 1021-1031.

Jiang, Tianyi, and Enrique Cadenas. "Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age." *Aging cell* 13.6 (2014): 1059-1067.

Joseph, Anna-Maria, et al. "Dysregulation of mitochondrial quality control processes contribute to sarcopenia in a mouse model of premature aging." *PLoS One* 8.7 (2013): e69327.

Joseph, James A., Barbara Shukitt-Hale, and Lauren M. Willis. "Grape juice, berries, and walnuts affect brain aging and behavior." *The Journal of nutrition* 139.9 (2009): 1813S-1817S.

Jurk, Diana, et al. "Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response." *Aging cell* 11.6 (2012): 996-1004.

Kabe, Yasuaki, et al. "Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus." *Antioxidants & redox signaling* 7.3-4 (2005): 395-403.

Kageyama, Yusuke, et al. "Mitochondrial division ensures the survival of postmitotic neurons by suppressing oxidative damage." *Journal of Cell Biology* 197.4 (2012): 535-551.

Kang, Chanhee, et al. "The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4." *Science* 349.6255 (2015): aaa5612.

Kato, Takashi, et al. "Brain fluorodeoxyglucose (FDG) PET in dementia." *Ageing research reviews* 30 (2016): 73-84.

Katsumi, Tomohiro, et al. "Activated cholangiocytes release macrophage-polarizing extracellular vesicles bearing the DAMP S100A11." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 317.4 (2019): C788-C799.

Kebir, Hania, et al. "Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation." *Nature medicine* 13.10 (2007): 1173-1175.

Keller, Jeffrey N., Keith B. Hanni, and William R. Markesbery. "Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress." *Mechanisms of ageing and development* 113.1 (2000): 61-70.

Kepchia, Devin, et al. "Geroprotective effects of Alzheimer's disease drug candidates." *Aging* (Albany NY) 13.3 (2021): 3269.

Klinge, Carolyn M., et al. "Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors α and β by coactivators and corepressors." *Journal of molecular endocrinology* 33.2 (2004): 387-410.

Knott, Andrew B., et al. "Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration." *Nature Reviews Neuroscience* 9.7 (2008): 505-518.

Knott, Eric P., et al. "Phosphodiesterase inhibitors as a therapeutic approach to neuroprotection and repair." *International journal of molecular sciences* 18.4 (2017): 696.

Kochunov, Peter, et al. "Age-related morphology trends of cortical sulci." *Human brain mapping* 26.3 (2005): 210-220.

Kodali, Maheedhar, et al. "Metformin treatment in late middle age improves cognitive function with alleviation of microglial activation and enhancement of autophagy in the hippocampus." *Aging Cell* 20.2 (2021): e13277.

Koopmans, Sietse Jan, and Teun Schuurman. "Considerations on pig models for appetite, metabolic syndrome and obese type 2 diabetes: From food intake to metabolic disease." *European journal of pharmacology* 759 (2015): 231-239.

Kowald, Axel, and Thomas BL Kirkwood. "Accumulation of defective mitochondria through delayed degradation of damaged organelles and its possible role in the ageing of post-mitotic and dividing cells." *Journal of theoretical biology* 202.2 (2000): 145-160.

Kumar, Premranjan, Ob W. Osahon, and Rajagopal V. Sekhar. "GlyNAC (glycine and N-acetylcysteine) supplementation in old mice improves brain glutathione deficiency, oxidative stress, glucose uptake, mitochondrial dysfunction, genomic damage, inflammation and neurotrophic factors to reverse age-associated cognitive decline: implications for improving brain health in aging." *Antioxidants* 12.5 (2023): 1042.

Kumar, Rajesh, et al. "Brain axial and radial diffusivity changes with age and gender in healthy adults." *Brain research* 1512 (2013): 22-36.

Landfield, Philip W., James L. McGaugh, and Gary Lynch. "Impaired synaptic potentiation processes in the hippocampus of aged, memory-deficient rats." *Brain research* 150.1 (1978): 85-101.

Leal, Stephanie L., and Michael A. Yassa. "Perturbations of neural circuitry in aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease." *Ageing research reviews* 12.3 (2013): 823-831.

Leandro, Giovana S., Peter Sykora, and Vilhelm A. Bohr. "The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 776 (2015): 31-39.

Lee, Kyung-Eon, et al. "The extracellular vesicle of gut microbial *Paenibacillus hominis* is a risk factor for vagus nerve-mediated cognitive impairment." *Microbiome* 8 (2020): 1-18.

Lee, Suckwon, et al. "A guide to senolytic intervention in neurodegenerative disease." *Mechanisms of ageing and development* 200 (2021): 111585.

Leeman, Dena S., et al. "Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging." *Science* 359.6381 (2018): 1277-1283.

Lehallier, Benoit, et al. "Undulating changes in human plasma proteome profiles across the lifespan." *Nature medicine* 25.12 (2019): 1843-1850.

Lepenietier, Gildas, et al. "Cytokine and immune cell profiling in the cerebrospinal fluid of patients with neuro-inflammatory diseases." *Journal of neuroinflammation* 16 (2019): 1-11.

Li, Xiao, et al. "*Acer truncatum* seed oil alleviates learning and memory impairments of aging mice." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (2021): 680386.

Li, Xinna, et al. "Four anti-aging drugs and calorie-restricted diet produce parallel effects in fat, brain, muscle, macrophages, and plasma of young mice." *Geroscience* 45.4 (2023): 2495-2510.

Limbad, Chandani, et al. "Astrocyte senescence promotes glutamate toxicity in cortical neurons." *PloS one* 15.1 (2020): e0227887.

Lin, Mei-Yao, and Zu-Hang Sheng. "Regulation of mitochondrial transport in neurons." *Experimental cell research* 334.1 (2015): 35-44.

- Lin, Sheng-Cai, and D. Grahame Hardie. "AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status." *Cell metabolism* 27.2 (2018): 299-313.
- Lindholm, Dan, et al. "Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation." *The Journal of cell biology* 117.2 (1992): 395-400.
- Liu, Zuyun, et al. "Underlying features of epigenetic aging clocks in vivo and in vitro." *Aging cell* 19.10 (2020): e13229.
- Lodato, Michael A., et al. "Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons." *Science* 359.6375 (2018): 555-559.
- Loh, Kim, et al. "Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity." *Cell metabolism* 10.4 (2009): 260-272.
- Lu, Tao, et al. "Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain." *Nature* 429.6994 (2004): 883-891.
- Lu, Tao, et al. "REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease." *Nature* 507.7493 (2014): 448-454.
- Lupo, Giuseppe, et al. "Molecular signatures of the aging brain: finding the links between genes and phenotypes." *Neurotherapeutics* 16.3 (2019): 543-553.
- Madan, Christopher R. "Age-related decrements in cortical gyrification: Evidence from an accelerated longitudinal dataset." *Journal of Neuroscience* (2020).
- Maglione, Marta, et al. "Spermidine protects from age-related synaptic alterations at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses." *Scientific Reports* 9.1 (2019): 19616.
- Majeed, Muhammed, et al. "Investigation of repeated dose (90 day) oral toxicity, reproductive/ developmental toxicity and mutagenic potential of 'Calebin A'." *Toxicology reports* 2 (2015): 580-589.
- Mandal, Pravat K., Manjari Tripathi, and Sreedevi Sugunan. "Brain oxidative stress: detection and mapping of anti-oxidant marker 'Glutathione' in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy." *Biochemical and biophysical research communications* 417.1 (2012): 43-48.
- Mangialasche, Francesca, et al. "Alzheimer's disease: clinical trials and drug development." *The Lancet Neurology* 9.7 (2010): 702-716.
- Marcoux, Genevieve, et al. "Platelet-derived extracellular vesicles convey mitochondrial DAMPs in platelet concentrates and their levels are associated with adverse reactions." *Transfusion* 59.7 (2019): 2403-2414.
- Mark, Robert J., et al. "Amyloid β -peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation." *Journal of Neuroscience* 17.3 (1997): 1046-1054.
- Marnier, Lisbeth, et al. "Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age." *Journal of comparative neurology* 462.2 (2003): 144-152.

Marosi, Krisztina, et al. "3-Hydroxybutyrate regulates energy metabolism and induces BDNF expression in cerebral cortical neurons." *Journal of neurochemistry* 139.5 (2016): 769-781.

Mattson, Mark P. "Apoptosis in neurodegenerative disorders." *Nature reviews Molecular cell biology* 1.2 (2000): 120-130.

Mattson, Mark P. "Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders." *Experimental gerontology* 44.10 (2009): 625-633.

Mattson, Mark P. "Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease." *Cell metabolism* 16.6 (2012): 706-722.

Mattson, M. P., and M. K. Meffert. "Roles for NF- κ B in nerve cell survival, plasticity, and disease." *Cell Death & Differentiation* 13.5 (2006): 852-860.

Mattson, Mark P., and Thiruma V. Arumugam. "Hallmarks of brain aging: adaptive and pathological modification by metabolic states." *Cell metabolism* 27.6 (2018): 1176-1199.

McEwen, Bruce S., and John H. Morrison. "The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course." *Neuron* 79.1 (2013): 16-29.

McQuail, Joseph A., Charles J. Frazier, and Jennifer L. Bizon. "Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling." *Trends in molecular medicine* 21.7 (2015): 450-460.

Miller, Marshall G., et al. "Dietary strawberry improves cognition in a randomised, double-blind, placebo-controlled trial in older adults." *British Journal of Nutrition* 126.2 (2021): 253-263.

Ming, Guo-li, and Hongjun Song. "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions." *Neuron* 70.4 (2011): 687-702.

Minogue, Aedín M., et al. "Age-associated dysregulation of microglial activation is coupled with enhanced blood-brain barrier permeability and pathology in APP/PS1 mice." *Neurobiology of aging* 35.6 (2014): 1442-1452.

Moloney, Aileen M., et al. "Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling." *Neurobiology of aging* 31.2 (2010): 224-243.

Moreno, Cristina, et al. "Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac ion channels." *Frontiers in physiology* 3 (2012): 25629.

Moreno-Blas, Daniel, et al. "Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy." *Aging (Albany NY)* 11.16 (2019): 6175.

Moreno-García, Alexandra, et al. "An overview of the role of lipofuscin in age-related neurodegeneration." *Frontiers in neuroscience* 12 (2018): 464.

Morozov, Yury M., et al. "Ultrastructural evidence for impaired mitochondrial fission in the aged rhesus monkey dorsolateral prefrontal cortex." *Neurobiology of aging* 51 (2017): 9-18.

Mostafavi, Sara, et al. "A molecular network of the aging human brain provides insights into the pathology and cognitive decline of Alzheimer's disease." *Nature neuroscience* 21.6 (2018): 811-819.

Mou, Yi, et al. "Gut microbiota interact with the brain through systemic chronic inflammation: implications on neuroinflammation, neurodegeneration, and aging." *Frontiers in immunology* 13 (2022): 796288.

Mustapha, Muzaimi, et al. "Cerebral small vessel disease (CSVD)—lessons from the animal models." *Frontiers in physiology* 10 (2019): 441783.

Muyderman, Håkan, et al. "Mitochondrial glutathione protects against cell death induced by oxidative and nitrative stress in astrocytes." *Journal of neurochemistry* 102.4 (2007): 1369-1382.

Nagata, K., et al. "A quantitative study of physiological cerebral atrophy with aging: a statistical analysis of the normal range." *Neuroradiology* 29 (1987): 327-332.

Nagyösz, Péter, et al. "Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells." *Neurochemistry international* 57.5 (2010): 556-564.

Nakayama, Hironao, et al. "Regulation of mTOR signaling by semaphorin 3F-neuropilin 2 interactions in vitro and in vivo." *Scientific reports* 5.1 (2015): 11789.

Narita, Masako, et al. "Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes." *Science* 332.6032 (2011): 966-970.

Naureen, Zakira, et al. "Dietary supplements in neurological diseases and brain aging." *Journal of preventive medicine and hygiene* 63.2 Suppl 3 (2022): E174.

Navarro, Ana, and Alberto Boveris. "Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287.5 (2004): R1244-R1249.

Nicholson, Daniel A., et al. "Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments." *Journal of Neuroscience* 24.35 (2004): 7648-7653.

Nikolakopoulou, Angeliki M., et al. "Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss." *Nature neuroscience* 22.7 (2019): 1089-1098.

Nixon, Ralph A. "The role of autophagy in neurodegenerative disease." *Nature medicine* 19.8 (2013): 983-997.

Norden, Diana M., and JP3553257 Godbout. "Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation." *Neuropathology and applied neurobiology* 39.1 (2013): 19-34.

Nyquist, Paul A., et al. "Age differences in periventricular and deep white matter lesions." *Neurobiology of aging* 36.4 (2015): 1653-1658.

Nyúl-Tóth, Ádám, et al. "Expression of pattern recognition receptors and activation of the non-canonical inflammasome pathway in brain pericytes." *Brain, Behavior, and Immunity* 64 (2017): 220-231.

Obashi, Kazuki, and Shigeo Okabe. "Regulation of mitochondrial dynamics and distribution by synapse position and neuronal activity in the axon." *European Journal of Neuroscience* 38.3 (2013): 2350-2363.

Obermeier, Birgit, Richard Daneman, and Richard M. Ransohoff. "Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier." *Nature medicine* 19.12 (2013): 1584-1596.

Oettinghaus, Bjorn, et al. "Synaptic dysfunction, memory deficits and hippocampal atrophy due to ablation of mitochondrial fission in adult forebrain neurons." *Cell Death & Differentiation* 23.1 (2016): 18-28.

Okun, Eitan, Kathleen J. Griffioen, and Mark P. Mattson. "Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease." *Trends in neurosciences* 34.5 (2011): 269-281.

Olah, Marta, et al. "A transcriptomic atlas of aged human microglia." *Nature communications* 9.1 (2018): 539.

Onaolapo, Adejoke Y., Adebimpe Yemisi Obelawo, and Olakunle James Onaolapo. "Brain ageing, cognition and diet: a review of the emerging roles of food-based nootropics in mitigating age-related memory decline." *Current aging science* 12.1 (2019): 2-14.

Ong, Jia-Sin, et al. "Probiotics: the next dietary strategy against brain aging." *Preventive Nutrition and Food Science* 27.1 (2022): 1.

Ota, Hidetaka, and Ayuto Kodama. "Dasatinib plus quercetin attenuates some frailty characteristics in SAMP10 mice." *Scientific reports* 12.1 (2022): 2425.

Patel, Jigisha R., and Gregory J. Brewer. "Age-related differences in NFkB translocation and Bcl-2/Bax ratio caused by TNF α and Abeta42 promote survival in middle-age neurons and death in old neurons." *Experimental neurology* 213.1 (2008): 93-100.

Pecoraro-Bisogni, F., et al. "REST-dependent presynaptic homeostasis induced by chronic neuronal hyperactivity." *Molecular Neurobiology* 55 (2018): 4959-4972.

Pedrazzi, Marco, et al. "Selective proinflammatory activation of astrocytes by high-mobility group box 1 protein signaling." *The Journal of Immunology* 179.12 (2007): 8525-8532.

Peng, Ying, et al. "Catalase and peroxiredoxin 5 protect *Xenopus* embryos against alcohol-induced ocular anomalies." *Investigative ophthalmology & visual science* 45.1 (2004): 23-29.

Perluigi, Marzia, Aaron M. Swomley, and D. Allan Butterfield. "Redox proteomics and the dynamic molecular landscape of the aging brain." *Ageing research reviews* 13 (2014): 75-89.

Pernas, Lena, and Luca Scorrano. "Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function." *Annual review of physiology* 78 (2016): 505-531.

Petralia, Ronald S., Mark P. Mattson, and Pamela J. Yao. "Communication breakdown: the impact of ageing on synapse structure." *Ageing research reviews* 14 (2014): 31-42.

Pfefferbaum, Adolf, et al. "A quantitative magnetic resonance imaging study of changes in brain morphology from infancy to late adulthood." *Archives of neurology* 51.9 (1994): 874-887.

Picca, Anna, et al. "Age-and calorie restriction-related changes in rat brain mitochondrial DNA and TFAM binding." *Age* 35 (2013): 1607-1620.

Piechota, Malgorzata, et al. "Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence?." *Oncotarget* 7.49 (2016): 81099.

Porges, Eric C., et al. "Frontal gamma-aminobutyric acid concentrations are associated with cognitive performance in older adults." *Biological psychiatry: cognitive neuroscience and neuroimaging* 2.1 (2017): 38-44.

Porte, Yves, Marie-Christine Buhot, and Nicole Mons. "Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice." *Neurobiology of aging* 29.10 (2008): 1533-1546.

Prior, Marguerite, et al. "Selecting for neurogenic potential as an alternative for Alzheimer's disease drug discovery." *Alzheimer's & Dementia* 12.6 (2016): 678-686.

Proskovec, Amy L., et al. "Association of epigenetic metrics of biological age with cortical thickness." *JAMA network open* 3.9 (2020): e2015428-e2015428.

Raj, Kenneth, and Steve Horvath. "Current perspectives on the cellular and molecular features of epigenetic ageing." *Experimental Biology and Medicine* 245.17 (2020): 1532-1542.

Raj, Towfique, et al. "Integrative transcriptome analyses of the aging brain implicate altered splicing in Alzheimer's disease susceptibility." *Nature genetics* 50.11 (2018): 1584-1592.

Ransohoff, Richard M., and Britta Engelhardt. "The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system." *Nature Reviews Immunology* 12.9 (2012): 623-635.

Rebrin, Igor, Michael J. Forster, and Rajindar S. Sohal. "Effects of age and caloric intake on glutathione redox state in different brain regions of C57BL/6 and DBA/2 mice." *Brain research* 1127 (2007): 10-18.

Richardson, Ben D., et al. "Reduced GABAA receptor-mediated tonic inhibition in aged rat auditory thalamus." *Journal of Neuroscience* 33.3 (2013): 1218-1227.

Roman, Gustavo C., et al. "Mediterranean diet: The role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease." *Revue neurologique* 175.10 (2019): 724-741.

Rossi, S., et al. "Brain temperature, body core temperature, and intracranial pressure in acute cerebral damage." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 71.4 (2001): 448-454.

Rydström, Jan. "Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1757.5-6 (2006): 721-726.

Sadagurski, Marianna, Gillian Cady, and Richard A. Miller. "Anti-aging drugs reduce hypothalamic inflammation in a sex-specific manner." *Aging Cell* 16.4 (2017): 652-660.

Sakurai, Keisuke, et al. "Effects of Lactiplantibacillus plantarum OLL2712 on memory function in older adults with declining memory: A randomized placebo-controlled trial." *Nutrients* 14.20 (2022): 4300.

Sala-Llonch, Roser, David Bartrés-Faz, and Carme Junqué. "Reorganization of brain networks in aging: a review of functional connectivity studies." *Frontiers in psychology* 6 (2015): 136321.

Salat, David H., et al. "Thinning of the cerebral cortex in aging." *Cerebral cortex* 14.7 (2004): 721-730.

Salminen, Antero, et al. "Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype." *European Journal of Neuroscience* 34.1 (2011): 3-11.

Sato, Yuko, et al. "Novel bile acid biosynthetic pathways are enriched in the microbiome of centenarians." *Nature* 599.7885 (2021): 458-464.

Saura, Carlos A., and Jean-René Cardinaux. "Emerging roles of CREB-regulated transcription coactivators in brain physiology and pathology." *Trends in neurosciences* 40.12 (2017): 720-733.

Schaum, Nicholas, et al. "Ageing hallmarks exhibit organ-specific temporal signatures." *Nature* 583.7817 (2020): 596-602.

Schönfeld, Peter, and Georg Reiser. "Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy?-Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33.10 (2013): 1493-1499.

Schroeder, Sabrina, et al. "Dietary spermidine improves cognitive function." *Cell reports* 35.2 (2021).

Schubert, David, et al. "Geroneuroprotectors: effective geroprotectors for the brain." *Trends in pharmacological sciences* 39.12 (2018): 1004-1007.

Shah, Syed Zahid Ali, et al. "Role of the AMPK pathway in promoting autophagic flux via modulating mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases: Insight into prion diseases." *Ageing research reviews* 40 (2017): 51-63.

Shanbhag, Niraj M., et al. "Early neuronal accumulation of DNA double strand breaks in Alzheimer's disease." *Acta neuropathologica communications* 7 (2019): 1-18.

Shi, Qiaoqiao, et al. "Complement C3-deficient mice fail to display age-related hippocampal decline." *Journal of Neuroscience* 35.38 (2015): 13029-13042.

Shih, Andy Y., et al. "Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo." *Journal of Biological Chemistry* 280.24 (2005): 22925-22936.

Shimabukuro, Marilia Kimie, et al. "Lipid-laden cells differentially distributed in the aging brain are functionally active and correspond to distinct phenotypes." *Scientific reports* 6.1 (2016): 23795.

Shook, Brett A., et al. "Ventriculomegaly associated with ependymal gliosis and declines in barrier integrity in the aging human and mouse brain." *Aging cell* 13.2 (2014): 340-350.

Sierra, Amanda, et al. "Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile." *Glia* 55.4 (2007): 412-424.

Sikora, Ewa, et al. "Cellular senescence in brain aging." *Frontiers in aging neuroscience* 13 (2021): 646924.

Sinha, Krishnendu, et al. "Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis." *Archives of toxicology* 87 (2013): 1157-1180.

Snow, Wanda M., et al. "Roles for NF- κ B and gene targets of NF- κ B in synaptic plasticity, memory, and navigation." *Molecular neurobiology* 49 (2014): 757-770.

Son, Tae Gen, et al. "Plumbagin, a novel Nrf2/ARE activator, protects against cerebral ischemia." *Journal of neurochemistry* 112.5 (2010): 1316-1326.

Soreq, Lilach, et al. "Major shifts in glial regional identity are a transcriptional hallmark of human brain aging." *Cell reports* 18.2 (2017): 557-570.

Sowell, Elizabeth R., et al. "Mapping cortical change across the human life span." *Nature neuroscience* 6.3 (2003): 309-315.

Spielman, Lindsay J., Jonathan P. Little, and Andis Klegeris. "Inflammation and insulin/IGF-1 resistance as the possible link between obesity and neurodegeneration." *Journal of neuroimmunology* 273.1-2 (2014): 8-21.

Spindel, Oded N., and Bradford C. Berk. "Redox redux: protecting the ischemic myocardium." *The Journal of clinical investigation* 122.1 (2012): 30-32.

Spittau, Björn. "Aging microglia—phenotypes, functions and implications for age-related neurodegenerative diseases." *Frontiers in aging neuroscience* 9 (2017): 194.

Stahon, Katharine E., et al. "Age-related changes in axonal and mitochondrial ultrastructure and function in white matter." *Journal of Neuroscience* 36.39 (2016): 9990-10001.

Stauch, Kelly L., Phillip R. Purnell, and Howard S. Fox. "Aging synaptic mitochondria exhibit dynamic proteomic changes while maintaining bioenergetic function." *Aging (Albany NY)* 6.4 (2014): 320.

Stranahan, Alexis M., et al. "Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons." *Nature neuroscience* 11.3 (2008a): 309-317.

Stranahan, Alexis M., et al. "Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats." *Hippocampus* 18.11 (2008b): 1085-1088.

Suberbielle, Elsa, et al. "Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β ." *Nature neuroscience* 16.5 (2013): 613-621.

Sullivan, Patrick G., et al. "Exacerbation of damage and altered NF- κ B activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury." *Journal of Neuroscience* 19.15 (1999): 6248-6256.

Sulzer, David, et al. "Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin, and ceroid as macroautophagic responses during aging and disease." *Journal of neurochemistry* 106.1 (2008): 24-36.

Sweeney, Melanie D., Shiva Ayyadurai, and Berislav V. Zlokovic. "Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways." *Nature neuroscience* 19.6 (2016): 771-783.

Talamonti, Emanuela, et al. "Impairment of DHA synthesis alters the expression of neuronal plasticity markers and the brain inflammatory status in mice." *The FASEB Journal* 34.2 (2020): 2024.

Tasaki, Shinya, et al. "Multi-omic directed networks describe features of gene regulation in aged brains and expand the set of genes driving cognitive decline." *Frontiers in genetics* 9 (2018): 294.

Terman, Alexei, et al. "Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging." *Antioxidants & redox signaling* 12.4 (2010): 503-535.

Teschendorff, Andrew E. "A comparison of epigenetic mitotic-like clocks for cancer risk prediction." *Genome Medicine* 12 (2020): 1-17.

Thanan, Raynoo, et al. "Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer." *International journal of molecular sciences* 16.1 (2014): 193-217.

Thibault, Olivier, and Philip W. Landfield. "Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging." *Science* 272.5264 (1996): 1017-1020.

Thibault, Olivier, Robert Hadley, and Philip W. Landfield. "Elevated Postsynaptic [Ca²⁺] and L-Type Calcium Channel Activity in Aged Hippocampal Neurons: Relationship to Impaired Synaptic Plasticity." *Journal of Neuroscience* 21.24 (2001): 9744-9756.

Thomsen, Maj S., Lisa J. Routhé, and Torben Moos. "The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37.10 (2017): 3300-3317.

Todd, Krysti L., et al. "Ventricular and periventricular anomalies in the aging and cognitively impaired brain." *Frontiers in aging neuroscience* 9 (2018): 445.

Toescu, Emil C., Alexei Verkhratsky, and Philip W. Landfield. "Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging." *Trends in neurosciences* 27.10 (2004): 614-620.

Török, Orsolya, et al. "Pericytes regulate vascular immune homeostasis in the CNS." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.10 (2021): e2016587118.

Torres, Karen Cecília Lima, et al. "Immune senescence and biomarkers profile of Bambuí aged population-based cohort." *Experimental gerontology* 103 (2018): 47-56.

Twig, Gilad, et al. "Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy." *The EMBO journal* 27.2 (2008): 433-446.

Urban-Ciecko, Joanna, and Alison L. Barth. "Somatostatin-expressing neurons in cortical networks." *Nature Reviews Neuroscience* 17.7 (2016): 401-409.

Venkateshappa, C., et al. "Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease." *Neurochemical research* 37 (2012): 1601-1614.

Verkhratsky, Alexei, et al. "Astrocytes in Alzheimer's disease." *Neurotherapeutics* 7.4 (2010): 399-412.

Vina, Jose, and Consuelo Borras. "Women live longer than men: understanding molecular mechanisms offers opportunities to intervene by using estrogenic compounds." *Antioxidants & Redox Signaling* 13.3 (2010): 269-278.

von Bartheld, Christopher S. "Myths and truths about the cellular composition of the human brain: A review of influential concepts." *Journal of chemical neuroanatomy* 93 (2018): 2-15.

Wang, Daifeng, et al. "Comprehensive functional genomic resource and integrative model for the human brain." *Science* 362.6420 (2018): eaat8464.

Wardlaw, Joanna M., et al. "Perivascular spaces in the brain: anatomy, physiology and pathology." *Nature Reviews Neurology* 16.3 (2020): 137-153.

Wardlaw, Joanna M., Colin Smith, and Martin Dichgans. "Small vessel disease: mechanisms and clinical implications." *The Lancet Neurology* 18.7 (2019): 684-696.

Wardlaw, Joanna M., Maria C. Valdés Hernández, and Susana Muñoz-Maniega. "What are white matter hyperintensities made of? Relevance to vascular cognitive impairment." *Journal of the American Heart Association* 4.6 (2015): e001140.

Wei, Jie, et al. "Anthocyanins from black chokeberry (*Aroniamelanocarpa* Elliot) delayed aging-related degenerative changes of brain." *Journal of agricultural and food chemistry* 65.29 (2017): 5973-5984.

Weiser, Michael J., Christopher M. Butt, and M. Hasan Mohajeri. "Docosahexaenoic acid and cognition throughout the lifespan." *Nutrients* 8.2 (2016): 99.

Weisová, Petronela, et al. "Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons." *Journal of Neuroscience* 29.9 (2009): 2997-3008.

Wiesinger, Anne, et al. "Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis." *PloS one* 8.11 (2013): e80905.

Williams, Robert J., Kochupurackal P. Mohanakumar, and Philip M. Beart. "Neuro-nutraceuticals: The path to brain health via nourishment is not so distant." *Neurochemistry International* 89 (2015): 1-6.

Witte, A. Veronica, et al. "Long-chain omega-3 fatty acids improve brain function and structure in older adults." *Cerebral cortex* 24.11 (2014): 3059-3068.

Witte, A. Veronica, et al. "Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults." *Journal of Neuroscience* 34.23 (2014b): 7862-7870.

Wong, Wai T. "Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation." *Frontiers in cellular neuroscience* 7 (2013): 22.

Wosiski-Kuhn, Marlena, et al. "Glucocorticoid receptor activation impairs hippocampal plasticity by suppressing BDNF expression in obese mice." *Psychoneuroendocrinology* 42 (2014): 165-177.

Wraith, David C., and Lindsay B. Nicholson. "The adaptive immune system in diseases of the central nervous system." *The Journal of clinical investigation* 122.4 (2012): 1172-1179.

Wüllner, U., et al. "Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function." *Brain research* 826.1 (1999): 53-62.

- Ya, Jingyuan, Rais Reskiawan A. Kadir, and Ulvi Bayraktutan. "Delay of endothelial cell senescence protects cerebral barrier against age-related dysfunction: Role of senolytics and senomorphics." *Tissue Barriers* 11.3 (2023): 2103353.
- Yang, Jenq-Lin, et al. "Neurons efficiently repair glutamate-induced oxidative DNA damage by a process involving CREB-mediated up-regulation of apurinic endonuclease 1." *Journal of Biological Chemistry* 285.36 (2010): 28191-28199.
- Yang, Jenq-Lin, et al. "BDNF and exercise enhance neuronal DNA repair by stimulating CREB-mediated production of apurinic/aprimidinic endonuclease 1." *Neuromolecular medicine* 16 (2014): 161-174.
- Yang, Na, and Payel Sen. "The senescent cell epigenome." *Aging* (Albany NY) 10.11 (2018): 3590.
- Yang, Zhen, et al. "Correlation of an epigenetic mitotic clock with cancer risk." *Genome biology* 17 (2016): 1-18.
- Yarchoan, Mark, et al. "Abnormal serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 is associated with tau pathology in Alzheimer's disease and tauopathies." *Acta neuropathologica* 128 (2014): 679-689.
- Yin, Fei, et al. "Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease." *Free Radical Biology and Medicine* 100 (2016): 108-122.
- Yoo, Min-Hyuk, et al. "Delineating the role of glutathione peroxidase 4 in protecting cells against lipid hydroperoxide damage and in Alzheimer's disease." *Antioxidants & redox signaling* 12.7 (2010): 819-827.
- Yoshii, Saori R., and Noboru Mizushima. "Monitoring and measuring autophagy." *International journal of molecular sciences* 18.9 (2017): 1865.
- Youle, Richard J., and Derek P. Narendra. "Mechanisms of mitophagy." *Nature reviews Molecular cell biology* 12.1 (2011): 9-14.
- Yousef, Hanadie, et al. "Aged blood impairs hippocampal neural precursor activity and activates microglia via brain endothelial cell VCAM1." *Nature medicine* 25.6 (2019): 988-1000.
- Yu, Lei, et al. "Targeted brain proteomics uncover multiple pathways to Alzheimer's dementia." *Annals of neurology* 84.1 (2018): 78-88.
- Zhang, Guo, et al. "Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH." *Nature* 497.7448 (2013): 211-216.
- Zhang, Jingwen, et al. "Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation." *Ageing research reviews* 25 (2016): 55-69.
- Zhang, Shi, Erez Eitan, and Mark P. Mattson. "Early involvement of lysosome dysfunction in the degeneration of cerebral cortical neurons caused by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal." *Journal of neurochemistry* 140.6 (2017): 941-954.
- Zhang, Xin, et al. "Oxidation resistance 1 is a novel senolytic target." *Aging cell* 17.4 (2018): e12780.

SITOGRAFIA

Abcam.com (<https://www.abcam.com/products/biochemicals/qnznfkb-inhibitorab141588.html>)

Alhadis (<https://it.wikipedia.org/wiki/Spermidina>)

Edgar (<https://en.wikipedia.org/wiki/Hypusine>)

Edgar[b] (<https://en.wikipedia.org/wiki/Navitoclax>)

Edgar[c] (https://en.wikipedia.org/wiki/Nordihydroguaiaretic_acid)

Edgar[d] (<https://it.wikipedia.org/wiki/Crocina>)

Edgar[e] (<https://it.wikipedia.org/wiki/Eucaliptolo>)

Edgar[f] (https://it.wikipedia.org/wiki/Acido_rosmarinico)

Emeldir (<https://it.wikipedia.org/wiki/Cumarina>)

Fvasconcellos (<https://it.wikipedia.org/wiki/Resveratrolo>)

Fvasconcellos[b] (<https://en.wikipedia.org/wiki/Dasatinib>)

Fvasconcellos[c] (<https://it.wikipedia.org/wiki/Metformina>)

Fvanconcellos[d] (<https://it.wikipedia.org/wiki/Sirolimus>)

Innbiotecpharma.com (<https://innbiotecpharma.com/en/glutatione-en>)

Innerstream (<https://en.wikipedia.org/wiki/Piceatannol>)

Lgcstandards.com (<https://www.lgcstandards.com/IT/it/17-alpha-Estradiol/p/DRE-C13213000>)

Medchemexpress.com (<https://www.medchemexpress.com/VAS2870>)

Mysid, Dmacks (<https://it.wikipedia.org/wiki/Curcuminoidi>)

Neurotiker (<https://it.wikipedia.org/wiki/Tiamina>)

Neurotiker[b] (<https://it.wikipedia.org/wiki/Cobalamina>)

Nono (<https://it.wikipedia.org/wiki/4-idrossicumarina>)

Oks (https://it.wikipedia.org/wiki/Vitamina_B6)

Sigmaaldrich.com (<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/mm/506172>)

Sobkowski (<https://it.wikipedia.org/wiki/Tannino>)

Vaccinationist (<https://it.wikipedia.org/wiki/Acarbosio>)

Vaccinationist[b] (<https://it.wikipedia.org/wiki/Caffeina>)

Wikipedia.org[autore ignoto] (https://it.wikipedia.org/wiki/Gallato_di_epigallocatechina)

Yikrazuul (https://it.wikipedia.org/wiki/Acido_ascorbico)

Yikrazuul[b] (<https://it.wikipedia.org/wiki/Canagliflozin>)

Yikrazuul[c] (<https://it.wikipedia.org/wiki/Astaxantina>)

Yikrazuul[d] (<https://it.wikipedia.org/wiki/Quercetina>)