



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE MEDICHE E MEDICINA MOLECOLARE

XXII CICLO

**Analisi quantitativa
del 24S-idrossicolesterolo come
applicazione clinica della LC-MS/MS alle
malattie neurologiche:
Alzheimer e demenza vascolare**

Michela Perrone Donnorso

A.A. 2009/2010

Docente Guida : Prof. Claudio Cortese

Coordinatore : Prof. Giorgio Federici

Indice

1. Introduzione	3
1.1 <i>Malattie neurologiche e sistema nervoso</i>	3
1.2 <i>Le Demenze</i>	8
1.2.1 Definizioni	8
1.2.2 Classificazione delle demenze	11
1.2.3 Epidemiologia delle demenze	14
1.2.4 Sintomi della demenza	15
1.2.5 Stadiazione della demenza	17
1.2.6 Demenza e invecchiamento: Mild Cognitive Impairment (MCI).....	17
1.3 <i>Malattia di Alzheimer</i>	21
1.3.1 Sintomi	22
1.3.2 Fisiopatologia.....	22
1.3.3 Cause della Malattia.....	28
1.3.4 Fattori di Rischio e Fattori Protettivi	31
1.4 <i>Demenza Vascolare</i>	34
1.4.1 MID : sintomi.....	35
1.4.2 Diagnosi	36
1.5 <i>Cromatografia liquida</i>	51
1.6 <i>La spettrometria di massa</i>	53
2. Parte sperimentale : sviluppo del metodo per il dosaggio del 24S-idrossicolesterolo nel siero	66
2.1 <i>Reagenti e prodotti chimici</i>	66
2.2 <i>Strumentazione</i>	66
2.3 <i>Preparazione delle soluzioni standard</i>	67
2.2 <i>Preparazione della curva di calibrazione</i>	67
2.3 <i>Preparazione del campione</i>	67
2.4 <i>Analisi strumentale</i>	68
3. Risultati e discussione	69
3.1 <i>Validazione del metodo</i>	72
3.2 <i>Dosaggio dei campioni</i>	79
3.3 <i>Discussione</i>	84
4. Bibliografia	66

1. Introduzione

1.1 Malattie neurologiche e sistema nervoso

La definizione ‘malattie neurologiche’ comprende tutte quelle condizioni che interessano il sistema nervoso, ossia quel sistema che, comprendendo tutti i tessuti nervosi dell’organismo umano, è la sede dell’assunzione, elaborazione e trasmissione delle informazioni relative a tutto il corpo umano di cui di conseguenza regola le funzioni. I responsabili del trasferimento e dell’elaborazione delle informazioni nel sistema nervoso sono i neuroni o cellule nervose, che si trovano ad adempiere cinque funzioni fondamentali: ricevere informazioni (input) dall’ambiente esterno o interno, oppure da altri neuroni; integrare le informazioni ricevute e produrre un’adeguata risposta in forma di segnale (output); condurre il segnale al suo terminale di uscita; trasmettere il segnale ad altre cellule nervose, ghiandole o muscoli; coordinare le proprie attività metaboliche, mantenendo l’integrità della cellula. Un neurone tipico (Figura 1) possiede un corpo cellulare, o soma, molte diramazioni, i dendriti sensoriali e un lungo assone che termina in una o più stazioni sinaptiche. A livello di ciascuna sinapsi il neurone è in rapporto con altre cellule.

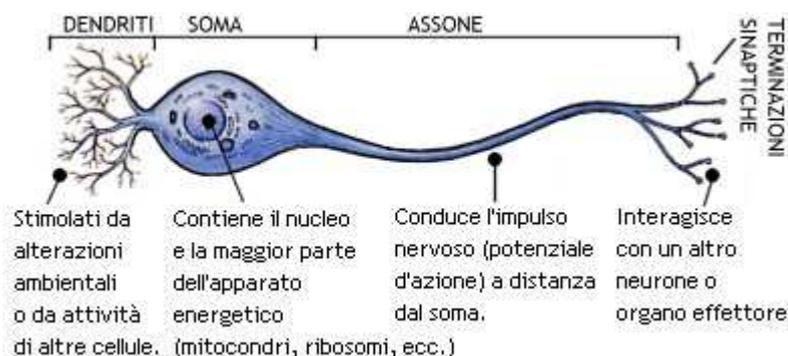


Figura 1. Rappresentazione di un neurone tipico.

Il soma è costituito dal nucleo ed gli altri organelli deputati alle principali funzioni cellulari (apparato di Golgi, neurofilamenti, neurotubuli, granuli di pigmento, sostanza tigreide, mitocondri, nucleo, reticolo endoplasmatico liscio e rugoso). L’assone presenta

lungo il proprio percorso una struttura esterna chiamata guaina mielinica che ha funzioni di protezione ed isolamento (con conseguente migliore trasmissione del segnale) ed una interna, il citoscheletro, che ha funzione di supporto strutturale ed è composto da tre tipi di proteine: i microtubuli, i neurofilamenti ed i microfilamenti (Figura 2).

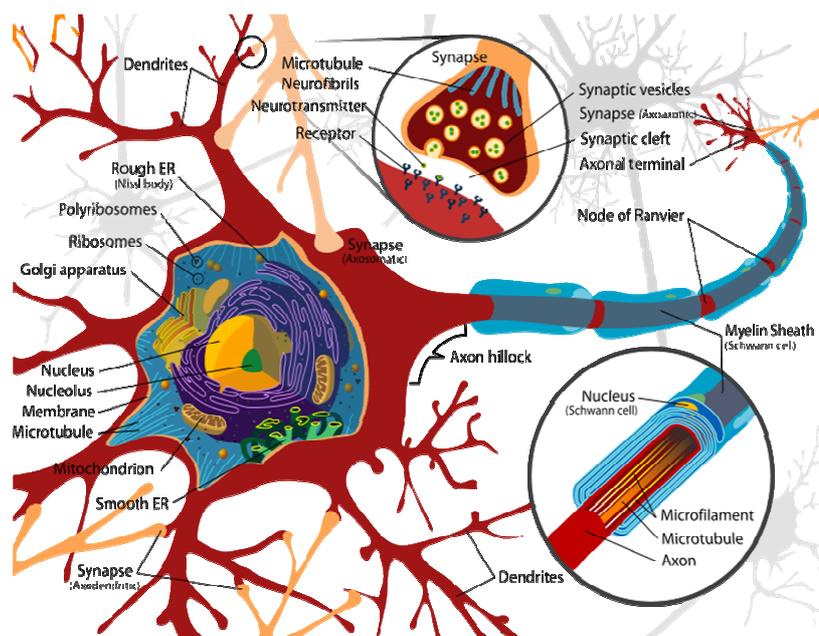


Figura 2. Rappresentazione in dettaglio di un neurone tipico.

Il sistema nervoso (Figura 3) viene diviso anatomicamente in due parti: il sistema nervoso centrale e il sistema nervoso periferico: Il sistema nervoso centrale (SNC) o neurasse è in grado di raccogliere, trasmettere e integrare informazioni ed è costituito dall'encefalo, racchiuso nella scatola cranica, e dal midollo spinale, contenuto invece nel canale vertebrale. Il sistema nervoso periferico (SNP) è costituito dai nervi, fibre nervose costituite dal prolungamento assonico del neurone, riunite in fasci, che svolgono essenzialmente la funzione di trasmissione del segnale tra neurasse e tutti i tessuti ed organi del corpo. Oltre ai nervi esso possiede anche i gangli che raggruppano i corpi cellulari dei neuroni presenti nei nervi.

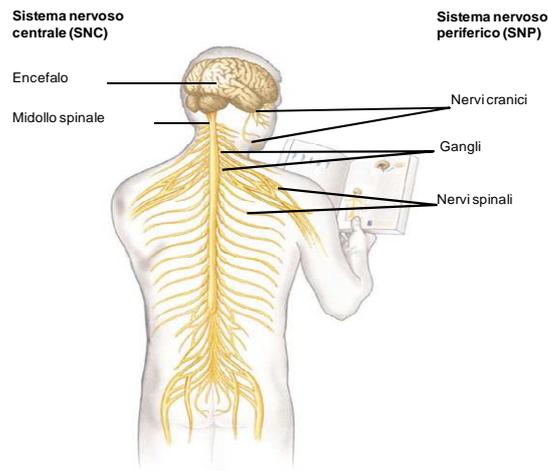


Figura 3. Rappresentazione del sistema nervoso centrale e periferico.

Il Sistema Nervoso Periferico si suddivide in due parti principali: Sistema Nervoso Somatico responsabile delle risposte volontarie e Sistema Nervoso Autonomo, o Vegetativo, responsabile delle risposte involontarie, il quale a sua volta si distingue in simpatico e parasimpatico. Il primo stimola il cuore, dilata i bronchi, contrae le arterie, modula le funzioni dell'apparato digerente e prepara l'organismo all'attività fisica, mentre il secondo è un sistema che predispone all'alimentazione, alla digestione, al sonno e al riposo.

Il sistema nervoso centrale (Figura 4) rappresenta una struttura molto complessa e può essere suddiviso essenzialmente in tre parti fondamentali: il prosencefalo, costituito da diencefalo e telencefalo, il mesencefalo e il romboencefalo, costituito da mielencefalo (midollo allungato o bulbo) e metencefalo (ponte e cervelletto). Fanno parte del diencefalo il talamo, deputato al controllo dell'attività motoria e alla sensazione di dolore e l'ipotalamo coinvolto nella secrezione di molti ormoni e nel controllo della temperatura corporea, della pressione sanguigna, della sensazione di fame e di sete e degli stimoli sessuali. Il telencefalo (che comunemente viene chiamato cervello) è la porzione di encefalo che presenta la maggiore estensione nell'uomo, che avvolge il diencefalo ed è diviso dal taglio interemisferico in due emisferi cerebrali simmetrici, destro e sinistro, ognuno dei quali controlla la parte del corpo diametralmente opposta. Lo strato superficiale dei due emisferi prende il nome di corteccia cerebrale, una struttura di circa 3 mm di spessore, disposta in modo da formare pieghe (circonvoluzioni) e ricca di neuroni, i cui corpi cellulari riuniti insieme conferiscono il tipico colore grigio e la cui funzione è quella di dare origine a meccanismi mentali complessi come la memoria, la concentrazione, il pensiero, il linguaggio e la coscienza. Una serie di scissioni a livello della corteccia cerebrale, suddivide ciascun emisfero in quattro regioni diverse chiamate lobi (Figura 4): il lobo frontale, parietale,

temporale e occipitale, ciascuno dei quali elabora informazioni specifiche e svolge una diversa funzione. *I lobi frontali* (situati subito dietro la fronte) dirigono gran parte dell'attività del cervello, sono implicati in ogni forma di elaborazione del pensiero, nei processi decisionali, nella capacità critica, nella personalità, nella creatività, nell'espressione e nella gestione delle funzioni motorie comprese quelle legate al linguaggio. Un danno a carico di queste aree provoca aprassia, ovvero incapacità a eseguire un'azione finalizzata, la persona diventa inabile nel compiere anche le azioni più semplici. Risultano compromesse inoltre la capacità di deglutire, stare seduto e alzarsi in piedi; la deambulazione manifesta segni di ipotonia, il malato trascina i piedi e si china avanti con le ginocchia piegate. Può manifestarsi anche un importante cambiamento della personalità, per cui l'individuo lentamente perde la capacità d'iniziativa, di concentrazione, la volontà di raggiungere una meta e la capacità critica. La compromissione di queste funzioni ha perciò delle conseguenze notevoli sul piano sociale, poiché la persona non è in grado di inibire il proprio comportamento (compreso quello sociale), e ciò provoca un progressivo isolamento sociale. *I lobi temporali* (quelli sopra l'orecchio) controllano la comprensione del linguaggio scritto e parlato, l'udito e la memoria visiva e verbale. *I lobi occipitali*, sul lato posteriore della testa, sono responsabili delle elaborazioni visive. Il danneggiamento di quest'area pregiudica la capacità del paziente di trarre beneficio da ciò che vede; il campo visivo è ridotto e vi è perdita della visione periferica, è possibile vedere solo ciò che si ha davanti ma non quello che è di lato. Vengono perse le capacità di guardare verso l'alto, di mantenere l'attenzione su un oggetto fermo o di seguirne il movimento e di comprendere il linguaggio scritto. Queste modificazioni si ripercuotono anche sul piano emotivo: il paziente diventa sempre più agitato, compaiono comportamenti disturbanti come il wandering (muoversi senza un apparente scopo) e il frugare dappertutto, possono manifestarsi anche comportamenti violenti indirizzati verso altri (minacce, insulti, aggressività fisica e verbale). *I lobi parietali* presiedono alla ricezione e all'elaborazione delle informazioni sensoriali che provengono da tutto il corpo, all'orientamento spaziale, alla comprensione del linguaggio e alla concentrazione. Se quest'area è compromessa, l'individuo manifesta disorientamento spaziale, ovvero non è più in grado di riconoscere i luoghi, compresa la propria casa; presenta difficoltà a riconoscere le persone, in particolare i figli, i nipoti o le persone che non vedono frequentemente e i visi, compreso il proprio, ed è soggetto anche ad allucinazioni. Il soggetto perde la capacità di stabilire i rapporti di casualità, poiché non collega più né il prima né il dopo e questo accade perché viene persa la capacità di concentrazione e di attenzione. Possono inoltre comparire diverse forme di agnosia, le impressioni sensitive sono percepite ma gli oggetti non sono riconosciuti nelle loro caratteristiche, si ha pertanto agnosia visiva, tattile o acustica. Tutto ciò ha un effetto devastante sull'equilibrio emotivo del paziente che si sente in balia degli eventi,

incapace di controllare e comprendere l'ambiente che lo circonda e si sente a disagio, in ansia e in angoscia.

Sebbene i due emisferi siano strutturalmente simmetrici e dotati entrambi dei suddetti 4 lobi, alcune funzioni intellettive sono limitate a un solo emisfero. Le capacità di logica, matematica e abilità linguistica fanno riferimento in genere ai lobi nell'emisfero sinistro, mentre l'immaginazione, il talento artistico e percezioni sensoriali sono in relazione con i corrispondenti lobi posizionati nell'emisfero destro. La corteccia cerebrale ricopre uno strato di sostanza bianca formata da raggruppamenti di assoni rivestiti di mielina, che permette un trasporto veloce dei segnali e conferisce il tipico colore bianco. Fa parte di questa zona un corpo calloso che collega in profondità i due emisferi consentendo loro di elaborare insieme le informazioni, connessione che ci permette di parlare e pensare. Sotto il corpo calloso vi sono piccoli aggregati di sostanza grigia come i nuclei della base (chiamati così perché sostanza grigia separata dalla corteccia, alla base del telencefalo) adibiti alla coordinazione motoria, l'amigdala e l'ippocampo che insieme al talamo e all'ipotalamo (sostanza grigia del diencefalo) fanno parte di una unità funzionale, per la gran parte sottocorticale, chiamata sistema limbico, deputata al controllo degli impulsi e delle attività emozionali e comportamentali: l'amigdala è implicata nella mediazione delle principali risposte emotive, mentre l'ippocampo svolge soprattutto funzioni legate alla memoria emozionale e all'apprendimento. L'ipotalamo si occupa della percezione corporea delle emozioni, mentre il talamo, essendo per posizione l'elemento di interconnessione tra la corteccia cerebrale e il sistema limbico, trasmette tra di essi gli impulsi sensoriali (udito, vista, olfatto e gusto).

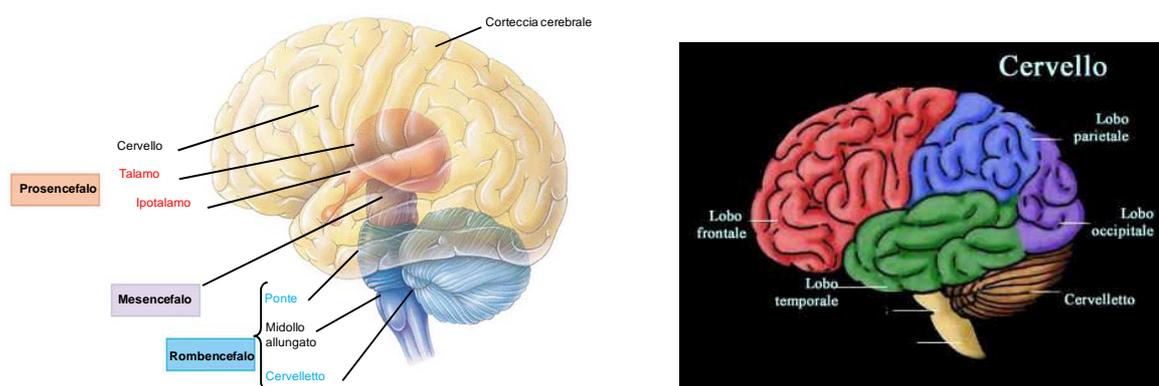


Figura 4. Struttura dell'encefalo e lobi della corteccia cerebrale.

Il mesencefalo è localizzato inferiormente al talamo e presenta quattro nuclei posteriori di sostanza grigia, chiamati corpi quadrigemini. Questi hanno due diverse funzioni: i superiori coordinano gli impulsi visivi mentre quelli inferiori gestiscono quelli uditivi.

Attraverso i nuclei rossi e la sostanza nera, il mesencefalo è responsabile del mantenimento del tono muscolare e del movimento degli arti superiori in funzione degli stimoli visivi e uditivi, inoltre una specifica regione regola il sonno e la veglia insieme al bulbo e al ponte di Varolio. Quest'ultimo è una protuberanza di sostanza bianca posta tra il midollo allungato e il mesencefalo e funge da mediatore tra cervello e cervelletto e tra midollo allungato e mesencefalo. E' attraversato da fasci nervosi, sensoriali, acustici e fasci motori destinati ai muscoli oculari ed include nel suo tessuto nuclei nervosi di sostanza grigia, coinvolti nella respirazione, nella masticazione e nella muscolatura facciale ed uditiva. Il midollo allungato è lungo 3cm e contiene tutti i neuroni sensoriali e motori di collegamento tra encefalo e midollo spinale e si trova a fianco del ponte di Varolio. Presenta all'interno sostanza grigia e all'esterno sostanza bianca ed ha il compito di controllare funzioni fondamentali per la sopravvivenza, come il ritmo respiratorio, il battito cardiaco, la vasocostrizione e la deglutizione, la digestione e il controllo del movimento. Il cervelletto è posto sotto la parte posteriore del cervello, dietro al midollo allungato e al ponte di Varolio. È formato da due emisferi, uniti da una formazione chiamata verme e ciascun emisfero è formato da lobi separati da scissure. La superficie è composta da uno strato di sostanza grigia formata da tipici neuroni chiamati cellule di Purkinje, i cui assoni si inoltrano nella sostanza bianca nella parte interna. Il cervelletto svolge il compito di controllare tutte le sensazioni, visive, tattili, di equilibrio e uditive che riceve dall'encefalo ed inoltre coordina i movimenti volontari e regola la postura e l'equilibrio attraverso il controllo del tono muscolare e la percezione della posizione delle varie parti del corpo.

Rientrano nella categoria delle malattie neurologiche le demenze, l'epilessia, la cefalea, la sclerosi multipla, le infezioni del sistema nervoso, i tumori cerebrali e molte altre patologie a carico del sistema nervoso centrale e periferico. Secondo un recente rapporto dell'OMS sulle malattie neurologiche nel mondo, un miliardo di persone, distribuite in ogni Paese, senza confini né distinzioni economiche, vive con una malattia neurologica, con 50 milioni di casi di epilessia e 24 milioni di casi di demenze.

1.2 Le Demenze

1.2.1 Definizioni

Con il termine demenza oggi si indicano numerosi disturbi di natura organica cerebrale ad eziopatogenesi diversa, caratterizzati dalla compromissione globale delle

funzioni cognitive in precedenza acquisite, in specifico della memoria, che hanno una ricaduta quasi immediata sulle relazioni interpersonali e sul comportamento di una persona fino a quel momento efficiente. Il termine “demenza” è stato introdotto per la prima volta in ambito medico nel 20 d.c. da Aulo Cornelio Celso, nel “De medicina” per indicare in modo generico, le condizioni di *alterazione dell’intelligenza e del comportamento*. Nel 1797, Pinel utilizzò il termine per descrivere le malattie che conducono ad una *abolizione delle capacità di pensiero*. Fu, però, un suo allievo Esquirol, che, nel 1838, diede al termine una primitiva identità clinica e introdusse la distinzione tra la Demenza, intesa come processo cerebrale acquisito, e il Ritardo Mentale congenito. Per tutto l’800, tuttavia, il paziente demente venne genericamente confuso con l’insano o il folle e solo all’inizio del ‘900, per opera di Kraepelin e grazie allo sviluppo delle tecniche di osservazione di neuropatologia, si delinearono i primi aspetti di inquadramento moderno delle demenze. Kraepelin rivoluzionò il concetto di demenza introducendo il termine di demenze organiche, *per definire le condizioni morbose, dovute a malattie del sistema nervoso centrale, che si caratterizzano per un preciso quadro neuropatologico e per la perdita irreversibile delle capacità intellettuali*. A partire dall’inizio del ‘900, la classificazione delle demenze è segnata dalla contrapposizione tra le forme degenerativo-abiotrofiche, rappresentate in primo luogo dalla malattia di Alzheimer, e quelle dipendenti dalle lesioni vascolari. La chiave di volta nella storia delle demenze data al 1906, quando Aloise Alzheimer, e successivamente Perusini e Bonfiglio nel 1910 in una descrizione più dettagliata, dimostrarono inequivocabilmente la presenza di un quadro clinico dementigeno, in assenza di una significativa compromissione vascolare, descrivendo i reperti istopatologici tipici in forma di degenerazione neurofibrillare e di placche senili.

L’importanza nosografia della demenza di Alzheimer fu però misconosciuta e poiché la descrizione originale corrispondeva ad una donna di 51 anni, venne inclusa da Kraepelin nel gruppo delle demenze presenili (Binswager ne introdusse il termine) anche se poi fu evidente che dopo i 65 anni la malattia era più frequente. Tuttavia fino alla seconda metà di questo secolo, l’interesse per gli aspetti diagnostici e clinici è rimasto piuttosto scarso e la demenza è stata considerata sia la via finale comune di svariate condizioni, che un processo inevitabile legato alla senescenza. La maggiore disponibilità di tecniche di studio del funzionamento del sistema nervoso centrale, in vivo e in modelli sperimentali, una più chiara conoscenza dei processi neuropsicologici ed una maggiore disponibilità di strumenti di analisi psicométrica e psicologica, l’avanzamento delle tecniche e conoscenze neuropatologiche hanno portato, a partire dagli anni 60, ad una maggiore caratterizzazione

clinica delle demenze ed alla loro distinzione sia dalle psicosi in generale che dalle modificazioni delle funzioni cognitive riscontrabili con l'invecchiamento (Bianchetti et al., 1999). L'introduzione di criteri clinici definiti che oggi fanno riferimento al DSM-IV TR del 2000 (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders Text Revision) dell'American Psychiatric Association e all'ICD-10 del 1992 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) dell'organizzazione mondiale della sanità (Tabella 1), permettono una più chiara e riproducibile differenziazione dalle altre condizioni patologiche nelle quali è possibile riscontrare un decadimento cognitivo.

Tabella 1. Criteri diagnostici delle sindromi demenziali secondo il DSM-IV e l'ICD-10

DSM-IV TR	ICD-10
<p>A)Sviluppo di molteplici deficit cognitivi che comprendono: 1)compromissione della memoria sia nell'apprendere nuove informazioni che nel richiamare informazioni precedentemente apprese 2) Uno o più deficit cognitivi tra: • afasia (disturbi del linguaggio) • agnosia (incapacità a riconoscere o identificare oggetti in assenza di deficit sensoriali) • aprassia (incapacità ad eseguire attività motorie) • deficit del pensiero astratto e delle capacità di critica (pianificare, organizzare)</p> <p>B)I deficit non si manifestano esclusivamente nel corso del delirium</p> <p>C)I deficit cognitivi sono sufficientemente gravi da causare una compromissione del funzionamento lavorativo o sociale</p> <p>D)Il deficit cognitivo deve rappresentare un declino rispetto ad un precedente più elevato livello di funzionamento</p> <p>E)E' correlata eziologicamente ad una patologia medica generale, all'effetto persistente di sostanza (compreso tossine) o alla combinazione di questi fattori</p>	<p>A)Disturbo di molteplici funzioni corticali superiori che comprendono: • compromissione della memoria particolarmente nell'apprendimento di nuovo materiale, ma anche di quello precedentemente appreso soprattutto negli stadi avanzati •pensiero •elaborazione dell'informazione • capacità critica (pianificare, organizzare)</p> <p>B)La coscienza resta lucida, tuttavia è possibile la sovrapposizione di diagnosi di delirium</p> <p>C)I deficit cognitivi sono accompagnati (o anche preceduti) da compromissione del controllo emotivo, del comportamento o delle motivazioni, interferenza con le attività personali della vita quotidiana (lavarsi, mangiare, vestirsi)</p> <p>D)Apprezzabile declino delle funzioni intellettive</p> <p>E)Si manifesta nella malattia di Alzheimer, nelle malattie cerebrovascolari e in altre condizioni che colpiscono primariamente o secondariamente il cervello</p> <p>F)Presenza dei sintomi e delle alterazioni da almeno 6 mesi</p>

I due sistemi diagnostici sono sostanzialmente sovrapponibili sebbene presentino piccole differenze ed evidenziano entrambi che la compromissione complessiva delle

funzioni cognitive distingue le demenze da altri disturbi neuropsicologici, con compromissione isolata di singole funzioni, come i disturbi afasici, nei quali è compromesso solo il linguaggio; evidenziano inoltre che oltre ai sintomi cognitivi sono presenti anche sintomi non cognitivi che riguardano la sfera della personalità, l'affettività, l'ideazione e la percezione, le funzioni vegetative, e il comportamento e che la malattia è acquisita, ossia colpisce individui in seguito al loro sviluppo cognitivo, seppur non richiedendo uno sviluppo normale, dato che un declino rispetto ad un precedente livello, può complicare anche un quadro di ritardo mentale, tipo sindrome di Down. Inoltre la gravità delle modificazioni delle funzioni intellettive è tale da interferire con gli atti quotidiani della vita di un individuo, e provoca trasformazioni della personalità e dell'umore.

Una terza definizione proposta dal Committee of Geriatrics del Royal College of Physicians (1981) e meno comunemente utilizzata, commisura l'importanza e l'entità del decadimento demenziale al tipo di richieste dell'ambiente socio-relazionale, nel quale l'individuo vive la sua quotidianità: «la demenza consiste in una compromissione globale delle funzioni corticali superiori, ivi compresa la memoria, la capacità di far fronte alle richieste della vita quotidiana e di svolgere le prestazioni percettivo-motorie, già acquisite in precedenza, di conservare un comportamento sociale adeguato alle circostanze e di controllare le proprie reazioni emotive; tutto ciò in assenza di compromissione dello stato di vigilanza».

1.2.2 Classificazione delle demenze

Esistono ad oggi diverse classificazioni delle demenze, in base all'età di esordio che può essere senile o presenile (oltre o prima dei 60 anni), in base alla sede delle lesioni (corticali o subcorticali) alla prognosi (degenerativa irreversibile e non degenerativa reversibile) e alla eziologia (idiopatiche o ad eziologia nota) che viene ormai presa come classificazione di riferimento. Nelle forme corticali predominano i disturbi della memoria, del linguaggio, delle abilità visuo-spaziali, del comportamento e della personalità con una scarsa compromissione motoria. Nelle demenze sottocorticali prevalgono, invece, le disfunzioni esecutive e i disturbi del movimento unitamente al rallentamento del processo cognitivo e alla difficoltà nella stazione eretta con frequenti cadute. Le demenze idiopatiche o primarie sono quelle di causa non nota, sono degenerative, irreversibili e a loro volta vengono suddivise in demenza di tipo Alzheimer e demenze degenerative non Alzheimer; mentre quelle ad eziologia nota o secondarie sono conseguenza di altre malattie, sono in gran

parte reversibili e vengono a loro volta suddivise, a seconda del tipo di processo eziopatogenetico che ne è alla base in: vascolari, meccaniche-strutturali, idrostatiche, trasmissibili, infiammatorie, paraneoplastiche, tossiche, nutrizionali e carenziali, disendocrine e dismetaboliche e psichiatriche (Sciarma e Felicioni, 2009)

Demenze idiopatiche (primarie, degenerative)

Alzheimer

Non Alzheimer

Demenze fronto-temporali (Malattia di Pick)

- Demenze con corpi di Lewy
- Disturbi del movimento con Demenza: Parkinson, PSP (Paralisi Sopranucleare Progressiva), CDB (Degenerazione Cortico-Basale), Corea di Huntington

Da cause note (secondarie)

Vascolari (multinfartuale, da singoli infarti, piccoli vasi, Malattia di Binswanger, emorragia)

Idrostatiche e meccanico-strutturali

- Traumi cranici (Ematoma subdurale, Demenza pugilistica)
- Processi occupanti spazio (ematomi o neoplasie cerebrali)
- Idrocefalo normoteso

Trasmissibili, infiammatorie, paraneoplastiche

- Meningiti ed encefaliti (Batteriche e virali)
- HIV-correlate
- Demenze da prioni, (Creutzfeldt-Jakob)
- Malattie infiammatorie croniche
- Paraneoplastiche
- Sclerosi Multipla
- Dimielinizzanti e dismielinizzanti

Tossiche

Alcool, abuso di droghe, farmaci, metalli

Nutrizionali e carenziali

- Carenza di tiamina (sindrome di Korsakof).
- Carenza di vitamina B12 e folati.
- Malnutrizione generale

Disendocrine, dismetaboliche

Ipo- e ipertiroidismo

Ipo- e iperparatiroidismo (ipo- e ipercalcemia)

Malattie dell'asse ipofisi-surrene (ipopituitarismo, sindrome di Cushing, morbo di Addison)

Encefalopatia porto-sistemica in corso di epatopatia

Insufficienza renale ed epatica.

Malattia di Wilson

Ipoglicemia

Disidratazione

Malattie metaboliche ereditarie

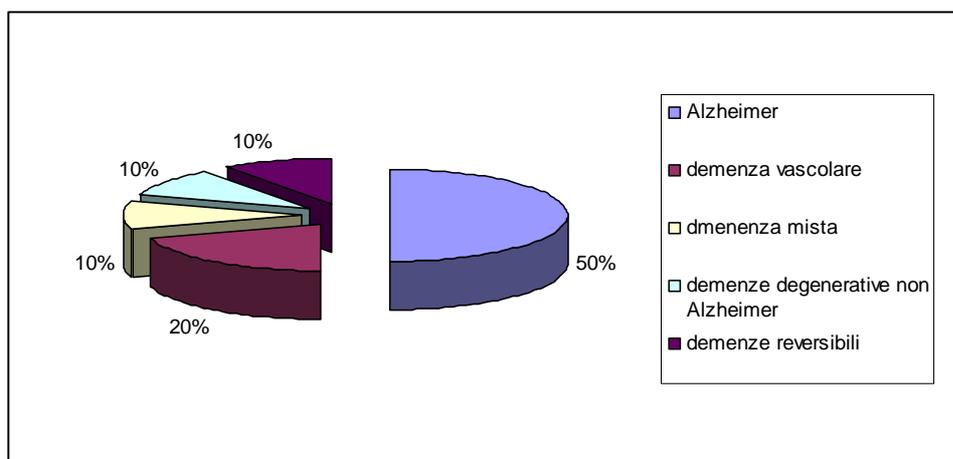
Psichiatriche :

depressione

schizofrenia

Malattia di Alzheimer, demenze fronto-temporali (Malattia di Pick), demenze con corpi di Lewy e Degenerazione Cortico-Basale sono demenze corticali; Parkinson, Paralisi Sopranucleare Progressiva, Corea di Huntington e demenze vascolari Malattia di Wilson sono demenze sottocorticali di sostanza grigia mentre sclerosi multipla, traumi cranici, encefalopatie, idrocefalo normoteso sono disturbi sottocorticali relativi alla sostanza bianca. La demenza vascolare può essere sia corticale che subcorticale. Tutte le demenze secondarie eccetto le demenze vascolari e le demenze da prioni, si possono considerare potenzialmente reversibili, purché si possa individuare la causa e vi sia la possibilità di trattarla prima che si vengano a determinare dei danni consistenti e irreversibili del sistema nervoso centrale. Indipendentemente dalla classificazione esistono oltre 100 cause di demenza, tra cui la malattia di Alzheimer (AD) e la demenza vascolare (VD), rappresentano le due principali forme di demenza, giustificando la prima oltre il 50% e la seconda circa il 20% di tutte le cause, mentre il 10% è costituito da casi di demenza-mista con sovrapposizione delle due patologie. Un altro 10% riunisce il gruppo delle demenze degenerative irreversibili come la malattia di Pick, la demenza a corpi di Lewy, il Parkinson, la Paralisi Sopranucleare Progressiva, la Degenerazione Cortico-Basale, la Corea di Huntington e le demenze da prioni. Il restante 10% è invece correlato alle demenze potenzialmente curabili e reversibili (meccaniche-strutturali, idrostatiche, trasmissibili, infiammatorie, paraneoplastiche, tossiche, nutrizionali e carenziali, disendocrine e dismetaboliche e psichiatriche).

Figura 5. Distribuzione % dei vari tipi di demenza.



1.2.3 Epidemiologia delle demenze

Nel complesso è affetto da demenza oggi circa il 5% della popolazione over 65 anni, ma addirittura il 30% degli over 85 e il 45% degli ultranovantenni. Negli ultimi decenni, in tutto il mondo si sta assistendo ad una vera e propria ascesa della demenza. I dati d'incidenza e prevalenza dei vari tipi di demenza ci proiettano verso uno scenario demografico assai preoccupante. Sulla base delle proiezioni delle Nazioni Unite riguardanti la popolazione mondiale fino al 2050, il numero di persone affette da demenza aumenterà notevolmente; se infatti nel 2000, era di 25.5 milioni, raggiungerà i 63 milioni nel 2030 e i 114 milioni nel 2050. In Asia, il fenomeno è particolarmente preoccupante poiché vi sono circa 13.5 milioni le persone affette da demenza (Trabucchi, 2001). Un gruppo internazionale di ricercatori ha pubblicato su the Lancet, un dato di prevalenza piuttosto preoccupante, in cui dichiara che in America ogni 7 secondi viene fatta una diagnosi di demenza (Ferri et al., 2005).

In Europa, secondo il Rapporto Demenza 2006, pubblicato da Alzheimer Europe, si calcola che le persone affette da demenza sono 6,4 milioni. Per quanto riguarda il nostro Paese, una recente indagine effettuata dalla Fondazione Censis, ha rilevato circa 520.000 malati di Alzheimer e ha stimato circa 80.000 nuovi casi l'anno. Si tratta comunque di un dato destinato ad aumentare: considerando l'attuale andamento demografico e il conseguente invecchiamento della popolazione possiamo prevedere, infatti, che nel 2020 i nuovi casi di demenza saliranno a 213.000 l'anno, di cui 113.000 saranno attribuibili all'Alzheimer.

1.2.4 Sintomi della demenza

E' molto difficile distinguere i primi segnali di demenza, poiché essi possono insorgere sporadicamente anche in persone sane, sia giovani che anziane, sebbene più frequentemente in soggetti affetti da demenza. L'Alzheimer's Association degli USA ha pubblicato un elenco dei principali 10 sintomi premonitori (comuni a tutte le demenze) che possono destare sospetti e che vanno tenuti sotto osservazione :

1. *Perdita di memoria che compromette la capacità lavorativa.* E' normale, di quando in quando, dimenticare un compito, una scadenza o il nome di un collega, ma la dimenticanza frequente o un'inspiegabile confusione mentale a casa o sul lavoro può significare che c'è qualcosa che non va. 2. *Difficoltà nelle attività quotidiane.* Una persona molto impegnata può confondersi di tanto in tanto: per esempio dimenticare qualcosa sui fornelli accesi o non ricordare di servire parte di un pasto. Il malato affetto da demenza potrebbe preparare un pasto e non solo dimenticare di servirlo ma anche scordare di averlo fatto. 3. *Problemi di linguaggio.* A tutti può essere capitato di avere una parola "sulla punta della lingua", ma il malato affetto da demenza può dimenticare parole semplici o sostituirle con parole improprie rendendo quello che dice difficile da capire. 4. *Disorientamento nel tempo e nello spazio.* E' normale dimenticare che giorno della settimana è o quello che si deve comprare, ma il malato affetto da demenza può perdere la strada di casa, non sapere dove si trova e come ha fatto a trovarsi là. 5. *Diminuzione della capacità di giudizio.* Scegliere di non portare una maglia o una giacca in una serata fredda è un errore comune, ma un malato affetto da demenza può vestirsi in modo inappropriato, indossando per esempio un accappatoio per andare a fare la spesa o due giacche in una giornata calda. 6. *Difficoltà nel pensiero astratto.* Compilare un libretto degli assegni può essere difficile per molta gente, ma per il malato affetto da demenza riconoscere i numeri o compiere calcoli può essere impossibile. 7. *La cosa giusta al posto sbagliato.* A chiunque può capitare di riporre male un portafoglio o le chiavi di casa. Un malato però, può mettere questi e altri oggetti in luoghi davvero singolari, come un ferro da stiro nel congelatore o un orologio da polso nel barattolo dello zucchero, e non ricordarsi come siano finiti là. 8. *Cambiamenti di umore o di comportamento.* Tutti quanti siamo soggetti a cambiamenti di umore, ma nel malato affetto da demenza questi sono particolarmente repentini e senza alcuna ragione apparente. 9. *Cambiamenti di personalità.* Invecchiando tutti possiamo cambiare la personalità, ma un malato affetto da demenza la può cambiare drammaticamente: da tranquillo diventa irascibile, sospettoso o diffidente. 10. *Mancanza di iniziativa.* E' normale stancarsi per le faccende domestiche, il lavoro o gli

impegni sociali, ma la maggior parte della gente mantiene interesse per le proprie attività. Il malato affetto da demenza lo perde progressivamente: in molte o in tutte le sue solite attività.

Successivamente questi sintomi premonitori sfociano nei sintomi d'esordio della malattia, che destano sospetti nei familiari inducendoli ad effettuare primi controlli. Essi sono rappresentati da difficoltà progressive a svolgere una o più delle seguenti attività: *Imparare e ricordare nuove informazioni*: è più ripetitivo; ha difficoltà a ricordare recenti conversazioni, eventi e appuntamenti; frequentemente posiziona gli oggetti in malo modo. *Eseguire compiti complessi*: ha difficoltà ad eseguire una serie complessa di pensieri o nell'eseguire compiti che richiedono numerose azioni. *Ragionare*: è incapace a rispondere con una ragionevole strategia a problemi insorti a casa o al lavoro; si mostra stranamente poco riguardoso delle regole sociali di comportamento. *Orientarsi*: ha difficoltà nell'orientamento durante la guida dell'automobile e tende a perdersi anche in luoghi familiari. Può manifestare difficoltà a ricordare il giorno della settimana o la data attuale. *Parlare*: ha difficoltà sempre maggiori a trovare le parole che esprimano ciò che vuole comunicare e a seguire le conversazioni. *Avere un comportamento adeguato*: è passivo e non reagisce adeguatamente alle differenti situazioni, è più irritabile e sospettoso del solito, interpreta in modo sbagliato stimoli uditivi o visivi. A volte si manifestano invece disturbi più selettivi e particolari come un disturbo del linguaggio (*afasia*), un disturbo nel riconoscimento dei volti familiari (*prosopoagnosia*) o altri disturbi isolati come una difficoltà nell'organizzare il movimento e aprassia. I sintomi conclamati sono un'accentuazione dei sintomi d'esordio, tutto ciò che era una semplice "difficoltà" diventa invece una "incapacità" e si distinguono in *sintomi cognitivi* (deficit mnesici, disorientamento temporale e spaziale, aprassia, afasia, alessia, agrafia, deficit di ragionamento astratto, di logica e giudizio, acalculia e agnosia, deficit visuospaziali) e *sintomi non cognitivi* (comportamentali e affettivi) solitamente improvvisi: psicosi (deliri paranoidei, strutturati o misidentificazioni; allucinazioni), alterazioni dell'umore (depressione, euforia, labilità emotiva), disturbi d'ansia (ossessioni, compulsioni, ipocondria), sintomi neurovegetativi (alterazioni del ritmo sonno-veglia, dell'appetito, del comportamento sessuale), disturbi dell'attività psicomotoria (vagabondaggio, affaccendamento afinalistico, acatisia), agitazione (aggressività verbale o fisica, vocalizzazione persistente), alterazioni della personalità (indifferenza, apatia, disinibizione, irritabilità). Ai sintomi cognitivi e non cognitivi si associano *compromissioni funzionali* consistenti nell'incapacità di portare a termine attività concrete e ricoprire ruoli sociali sia nelle attività base della vita quotidiana che in quelle complesse. Alcuni sintomi, sia d'esordio

che conclamati, sono più evidenti in certe forme di demenza piuttosto che in altre ed è su questi che si basa la diagnosi differenziale tra le varie demenze. Purtroppo però la maggior parte dei sintomi sono comuni a tutte le demenze rendendo difficile la distinzione.

1.2.5 Stadiazione della demenza

La demenza ha una durata media di 10 anni; dai sintomi riportati nel precedente paragrafo si evince che il quadro clinico subisce nel tempo variazioni importanti, con il susseguirsi e il sovrapporsi di modificazioni delle prestazioni cognitive, del quadro funzionale e comportamentale verso un progressivo peggioramento. Sebbene si possa tracciare un profilo dell'evoluzione clinica della demenza, ogni paziente presenta una certa variabilità, pertanto la suddivisione della demenza in stadi clinici (demenza lieve, moderata e grave) è certamente utile, soprattutto per la malattia di Alzheimer ma non può essere assunta come modello rigido e stereotipato dell'evoluzione clinica della malattia .

Il primo stadio (*demenza lieve*) dura da 2 a 4 anni, è caratterizzato dai sintomi d'esordio ed è facilmente evidenziato in pazienti giovani o che svolgono ancora attività lavorative o professionali, può invece sfuggire in pazienti anziani o che non svolgono compiti impegnativi da un punto di vista intellettuale.

In una fase intermedia della malattia (*demenza moderata*) di durata da 2-10 anni, i danni alla memoria si accentuano, compare anche amnesia remota e i primi sintomi conclamati cognitivi, non cognitivi e funzionali.

Nelle fasi avanzate della demenza (*demenza grave*) che durano mediamente 3 anni, i sintomi conclamati peggiorano, il paziente è incapace di svolgere qualsiasi attività della vita quotidiana e compare generalmente incontinenza. Non si riconoscono neanche i volti dei familiari più stretti, la memoria a breve e lungo termine è totalmente persa ed il paziente può divenire mutacico ed acinetico. E' in confusione e ha allucinazioni. Si manifesta disfagia e può essere necessaria l'alimentazione artificiale. Il rischio di complicanze, quali malnutrizione, disidratazione, malattie infettive (polmoniti soprattutto), fratture e piaghe da decubito diviene elevato.

Nelle fasi terminali della demenza sono frequenti complicanze infettive, soprattutto broncopolmonari, che costituiscono la causa più frequente di morte.

1.2.6 Demenza e invecchiamento: Mild Cognitive Impairment (MCI)

La demenza non è un'accentuazione del fisiologico processo di invecchiamento né una sua anticipazione temporale. Vi sono chiare differenze qualitative sia sul piano anatomopatologico che clinico-fenomenologico. Nell'anziano la disfunzione della memoria è

graduale e riguarda soprattutto la rievocazione del materiale mnesico; egli riesce comunque ad acquisire nuove informazioni; le funzioni intellettive globali sia pure un po' rallentate e meno elastiche, sono comunque conservate e le disfunzioni presenti non interferiscono in maniera significativa con la vita quotidiana. Tuttavia, mentre nella fase avanzata della malattia, la presenza dei disturbi comportamentali e psichici, che si associano ai disturbi cognitivi, permette di distinguere pazienti dementi da pazienti non dementi, tali differenze non sono ben distinguibili durante le fasi iniziali della malattia, caratterizzate soltanto da una lieve compromissione della sfera cognitiva, complicando quindi la diagnosi. Uno dei maggiori problemi nella distinzione fra i deficit neuropsicologici riscontrabili nelle fasi precoci della demenza e nell'invecchiamento è la scelta di gruppi di confronto appropriati. Ciò che si conosce del cosiddetto "invecchiamento cerebrale" è contaminato dalla presenza, nel gruppo dei cosiddetti "anziani sani", di soggetti con patologie in fase preclinica. In realtà infatti dal punto di vista clinico, le modalità di esordio e la storia naturale presentano possibilità di variazioni interindividuali che rendono difficile la descrizione di quadri clinici campione. La presenza di un decadimento cognitivo lieve, elemento che accomuna la demenza nelle fasi iniziali e l'invecchiamento, è stato oggetto di varie diatribe tra diversi studiosi ed è tuttora oggetto di critiche e discussioni, dal momento che c'è chi lo considera sintomo prodromico alla demenza e chi, invece, lo trascura, definendo le difficoltà cognitive come conseguenza del normale processo fisiologico. Tuttavia, l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) ha introdotto, nella decima versione della classificazione internazionale delle malattie, l'espressione di Mild Cognitive Impairment (MCI, deterioramento cognitivo lieve) per indicare un declino cognitivo che non raggiunge il livello della demenza, ma che rappresenta una fase di transizione tra il normale invecchiamento e la demenza, sull'ipotesi teorica che soggetti che hanno sviluppato demenza hanno attraversato, in precedenza, una fase di compromissione cognitiva lieve caratterizzata dalla compromissione di una singola area cognitiva, molto probabilmente la memoria, che interferisce solo lievemente con le normali attività del soggetto, mentre le altre funzioni cognitive sono preservate e vengono mantenute normali attività sociali e relazioni interpersonali (Petersen, 1995). Tali criteri selezionano una categoria di persone le cui funzioni cognitive generali sono simili a quelle di soggetti normali di controllo, mentre le funzioni mnesiche sono simili a quelle di pazienti affetti da demenza lieve. Circa il 10-15% dei pazienti affetti da MCI entro 1 anno dalla diagnosi sviluppano una demenza conclamata e il 50% entro 4 anni, mentre nel restante 50% una parte torna cognitivamente normale ai follow up successivi (Larrieu et al., 2002; Ritchie et al., 2001) e una parte invece resta stabile in questa condizione (Figura 6,7).

Lo scenario tipico dell'MCI implica un'iniziale presentazione del deficit di memoria, seguito da altre anomalie della sfera cognitiva, ma esistono altre manifestazioni iniziali della patologia in cui compaiono anche lievi deficit in altre funzioni cognitive quali, il linguaggio, le abilità visuo-spaziali, le funzioni esecutive, le capacità di ragionamento (Masur et al., 1994; Storandt et al., 1989; Storandt et al., 1984; Tierney et al., 1987). Nel corso del tempo si è osservato che tali deficit possono essere variabilmente associati fra loro producendo tre diverse tipologie di MCI:

MCI amnestico (a-MCI), multidominio (md-MCI), o singolo dominio diverso dalla memoria (snm-MCI). Nel primo caso si ha una compromissione marcata ed esclusiva della memoria, nel secondo caso è presente un deficit lieve in diversi domini cognitivi, fra cui spesso anche la memoria, nel terzo caso invece la compromissione è manifesta in un solo dominio diverso dalla memoria, spesso il linguaggio, mentre le altre funzioni sono conservate, come resta normale anche la capacità di compiere tutte le azioni legate alla vita quotidiana. Un recente studio ha dimostrato che i pazienti affetti da un MCI-multiple domain hanno una probabilità significativamente maggiore di sviluppare demenza rispetto ai pazienti che presentano un a-MCI (Alexopoulos et al., 2006). Inoltre, pazienti con MCI amnestico hanno maggiore probabilità di evolvere verso l'AD; quelli con compromissione in più domini possono teoricamente sviluppare l'AD o la VD, mentre quelli con compromissione del linguaggio sono più inclini allo sviluppo della FTD (Petersen et al., 2001; Petersen et al., 2004).

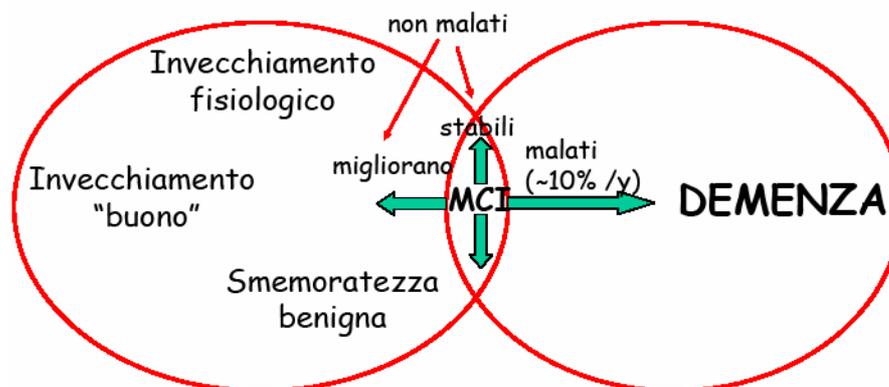
I criteri diagnostici per definire il MCI sono quelli proposti da Petersen et al, 1997, 1999. Tali criteri, che all'inizio individuavano in modo generale il MCI, attualmente si riferiscono esclusivamente alla forma amnesica di MCI (a-MCI single domain) (Petersen et al., 2001; Petersen 2004):

a) Presenza di un disturbo soggettivo di memoria, preferibilmente confermato da un familiare. b) Deficit di memoria maggiore di quello che ci si aspetterebbe nei soggetti di pari età e scolarità. c) Normale funzionamento cognitivo generale. d) Normali capacità di eseguire attività nella vita quotidiana; e) Assenza di demenza; f) Assenza di altre patologie in grado d'indurre disturbi di memoria (depressione, patologie endocrine ecc.).

Sarebbe perciò auspicabile una precoce diagnosi di MCI, dal momento che questo stadio di predemenza si è dimostrato rispondente ad una terapia farmacologica capace se non di arrestare la progressione verso la demenza franca, quanto meno di rallentarla. Ma la diagnosi clinica risulta attualmente molto difficile. Purtroppo in fase iniziale il quadro è povero di elementi utili in quanto vi è sì la compromissione di un dominio cognitivo ma è

frequente la sovrapposizione con soggetti normali, infatti non ci sono deficit funzionali o alterazioni comportamentali e il destino evolutivo dei pazienti non è univoco. Il tasso di conversione in demenza o il tempo di permanenza nella condizione di lieve declino cognitivo dipendono dall'interazione di numerosi fattori, i cui principali possono essere individuati nella presenza di componenti genetiche predisponenti, di comorbidità, di fattori ambientali facilitanti, ma anche di una personale "riserva cognitiva" che ogni individuo ha accumulato nella propria vita attraverso l'esperienza (Scarmeas, Stern, 2003). In questa fase possono essere d'aiuto le tecniche di neuroimaging (volume ippocampale), SPECT, dosaggio di marcatori biologici (A-beta 42 e Tau nel liquor), dati di neurofisiologia. La misura del volume ippocampale con Risonanza Magnetica ha mostrato valori maggiori nei controlli, intermedi negli MCI e piccoli negli AD (Xu et al., 2000). Uno studio recente con FDG-PET ha mostrato che un minor uptake di fluorodesossiglucosio nella corteccia temporoparietale destra può accuratamente definire i pazienti con MCI che convertiranno rapidamente (entro 18 mesi) ad AD. Probabilmente solo l'unione di più metodiche differenti potrà dare una maggior specificità diagnostica. Oltre alla diagnosi precoce, altri aspetti su cui attualmente il mondo scientifico è focalizzato, sono l'identificazione dei fattori di rischio per il MCI e l'identificazione nella popolazione con MCI di markers neurobiologici, neuroradiologici, clinici e neuropsicologici che possano essere in grado di predire precocemente lo sviluppo di AD (Caltagirone et al., 2002). Ultimamente è stato dimostrato che l'ipertensione diagnosticata intorno ai 50-60 anni (Kivipelto et al., 2001) e la presenza di bypass coronarico (Selnes et al., 2001) aumentano il rischio di sviluppare MCI e si sta studiando come il gene che codifica per ApoE4 costituisca fattore di rischio nonché predittore di conversione in Malattia di Alzheimer nei soggetti affetti da MCI.

Figura 6. Relazione tra invecchiamento, MCI e demenza.



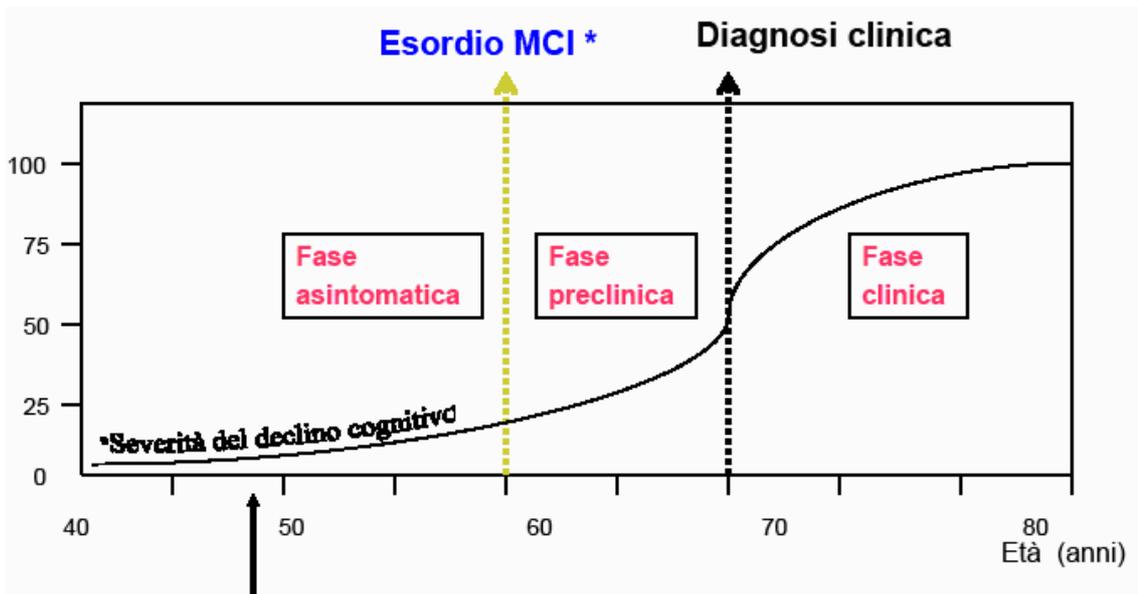


Figura 7. Evoluzione della demenza.

1.3 *Malattia di Alzheimer*

La malattia (o morbo) di Alzheimer viene classificata tra le demenze corticali e primarie ed è oggi definita come quel “processo degenerativo invalidante che distrugge progressivamente le cellule cerebrali, rendendo a poco a poco l'individuo che ne è affetto incapace di una vita normale”. Ha un esordio prevalentemente senile ma può manifestarsi anche in epoca presenile ed esistono anche rare forme familiari di insorgenza precoce, in genere nella IV e V decade di vita (Yu et al., 2000). La malattia di Alzheimer è stata descritta per la prima volta nel 1906 dal neuropatologo Alois Alzheimer, durante la Convenzione Psichiatrica di Tubingen (3-4 novembre 1906) quando Alzheimer presentò il caso di una donna di 51 anni affetta da una forma di demenza sconosciuta. Soltanto nel 1910, però, la malattia ebbe un nome, quando Emil Kraepelin, il più famoso psichiatra di lingua tedesca dell'epoca, ripubblicò il suo trattato "Psichiatria", nel quale definiva una nuova forma di demenza scoperta da Alzheimer, chiamandola appunto malattia di Alzheimer. Nella caratterizzazione della malattia ebbe un ruolo chiave anche un giovane ricercatore italiano di nome Gaetano Perusini, in quanto nel 1909 tre sue nuove osservazioni anatomocliniche molto dettagliate e i suoi studi negli anni successivi (1910-1911) consentirono la comprensione di alcuni rilevanti aspetti clinici e patologici, così che la malattia, detta in Germania "morbo di Alzheimer", divenne nota in Italia come "morbo di Alzheimer-Perusini". Kraepelin la ritenne una forma grave e precoce di demenza senile e questa caratterizzazione

gli parve sufficiente per definire una nuova categoria diagnostica che indicò, ufficialmente per la prima volta, con il nome di malattia di Alzheimer.

1.3.1 Sintomi

L'esordio sintomatico è a carattere "insidioso", i primi sintomi sono lievi, sono difficili da riconoscere e da distinguere dalle disattenzioni di una persona anziana sana. Anche nel momento in cui si riconosce il carattere patologico di alcuni comportamenti non è semplice arrivare ad una sicura diagnosi differenziale, in quanto alcuni sintomi sono comuni ad altre patologie, quali la depressione e la demenza multiinfartuale.

I sintomi caratteristici sono: perdita significativa della memoria (amnesia) prima recente e poi anche remota; cambiamenti di comportamento e alterazione dell'umore e della personalità con prevalenza di atteggiamenti aggressivi, deliri e allucinazioni; perdita di iniziativa e di interesse; problemi di linguaggio (afasia); confusione; perdita di orientamento nello spazio e nel tempo; incapacità nel riconoscere persone, cose e luoghi (agnosia); difficoltà nella scrittura (agrafia); incapacità a compiere gli atti quotidiani della vita quali lavarsi, vestirsi, mangiare (aprassia); peggioramento delle capacità di ragionamento, di pianificazione e di giudizio; disturbi motori. La malattia ha il tipico andamento progressivo delle demenze, suddiviso in 3 stadi e dura in media 7-10 anni.

1.3.2 Fisiopatologia

Dall'analisi post-mortem di tessuti cerebrali di pazienti affetti da Alzheimer, si è potuto riscontrare un accumulo extracellulare di una proteina costituita da 40 o 42 amminoacidi, chiamata beta-amiloide. Questa proteina proviene dalla beta-APP (amiloid protein precursor), una glicoproteina ubiquitaria transmembrana codificata da un gene posto su cromosoma 21, la cui lunghezza varia da 695 a 770 aminoacidi con l'estremità carbossiterminale rivolta verso il lato intracellulare e l'estremità amminoterminale glicosilata, più lunga, rivolta verso il versante extracellulare. Da quest'ultima proviene il peptide beta-amiloide che si trova esattamente a metà della proteina APP. La funzione fisiologica della beta-APP non è nota, ma si sa che va incontro ad un processo di scissione enzimatica in due passi successivi e secondo due diverse modalità. La prima modalità dà sempre luogo ad un peptide non patogeno e prevede una tappa catalizzata da un enzima detto *α-secretasi* in grado di scindere dal precursore un peptide a livello del 687-688 AA, nel

versante extra, vicino alla membrana, noto come sAPPalfa (frammento alfa solubile), che viene secreto ed un frammento C-terminale (C83) ancorato alla membrana tagliato successivamente dalla γ -secretasi, il cui sito di taglio è all'interno del doppio strato lipidico e la cui azione dà origine a tre frammenti privi di attività biologica: uno piccolissimo da 3KDa definito p3, uno un po' più lungo e uno che si chiama alfa-amiloide. La seconda modalità, differisce per l'enzima che interviene nella prima tappa, che in questo caso è la β -secretasi. Il sito di taglio della beta-secretasi è a livello degli amminoacidi 671-672 e si trova nel versante extra. In seguito al taglio β -secretasico viene prodotta una proteina, poi secreta, nota come sAPP β (frammento beta solubile), dal lato amino-terminale e una più piccola ancora legata alle membrana plasmatica dal lato carbossi-terminale (C99), la CTF β (Carboxy-Terminal Fragment β). Quest'ultimo residuo, è quello che va incontro al secondo taglio, da parte della γ -secretasi che genera a seconda del punto di taglio (sempre a livello del doppio strato lipidico), per il 90% proteine di beta-amiloide di 40 amminoacidi (A β 40) e, per la parte rimanente proteine di beta-amiloide con 42 amminoacidi, A β 42 (Golde, 2003).

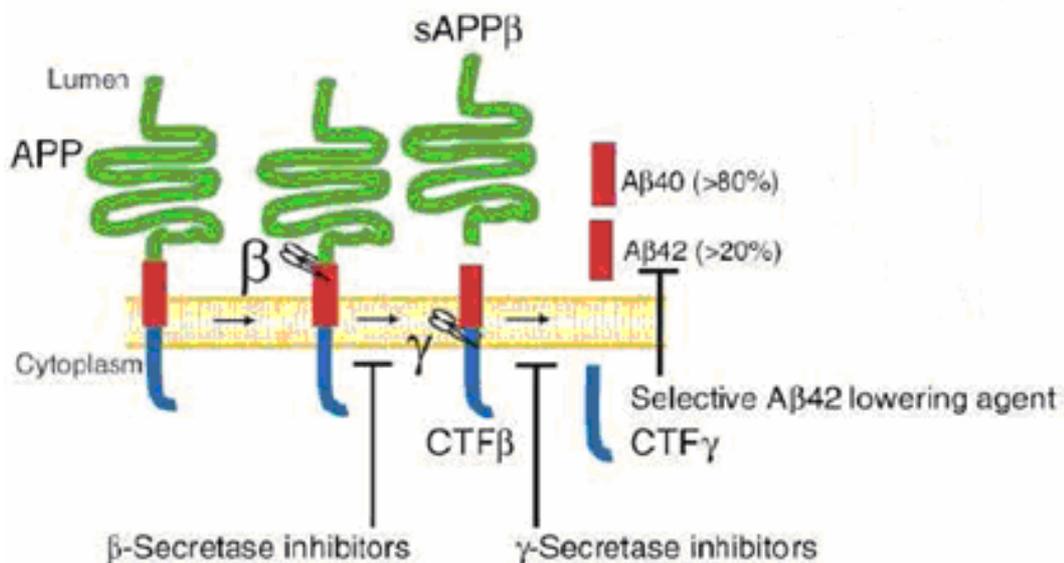


Figura 9. Meccanismo di formazione della proteina beta-amiloide

Queste ultime, inizialmente solubili, subiscono una modificazione conformazionale (misfolding), da alfa elica a foglietto beta che porta alla formazione, attraverso dimeri e oligomeri (Figura 10), di aggregati insolubili extracellulari sulla membrana dei neuroni, che

man mano si uniscono formando placche neuronali dette anche placche amiloidi, sulle quali si accumulano anche proteine di A β 40 e che tipicamente si osservano nei casi patologici (Querfurth, LaFerla, 2010).

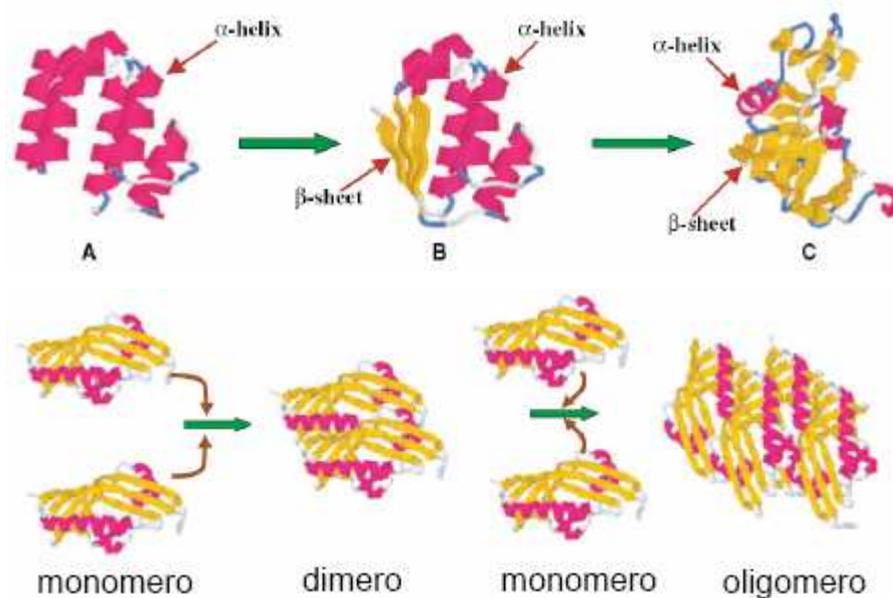


Figura 10. Processo di formazione della placca amiloide.

Tali placche innescano un processo infiammatorio che richiama macrofagi e neutrofili i quali produrranno citochine, interleuchine e TNFalfa che danneggiano irreversibilmente i neuroni. E' molto recente (Lustbader et al. 2004) uno studio in cui si sostiene che i depositi di beta-amiloide interagiscono con un enzima del mitocondrio chiamato ABAD portando alla distruzione del mitocondrio stesso ed, infine, alla morte dell'intera cellula neuronale. E' stato inoltre dimostrato che i depositi di beta-amiloide interagiscono con i lipidi della membrana cellulare portando a disgregazione della membrana stessa, stress ossidativo ed aumento della concentrazione del calcio intracellulare che conduce alla morte dei neuroni (Querfurth, LaFerla, 2010).

Placche amiloidee sono state osservate anche in persone anziane non affette dalla malattia, sebbene in maniera molto più ridotta, ciò ha portato a concludere che in realtà tutti produciamo la proteina beta-amiloide, ma il problema consiste nel suo smaltimento, così mentre normalmente essa viene digerita dopo essersi staccata dalla cellula, nei soggetti affetti da patologia non viene prontamente secreta ed ha la possibilità di formare insiemi insolubili e conseguentemente le placche. Per di più la correlazione tra densità delle placche

e gravità della malattia è molto incerta, tuttavia la loro presenza massiccia nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale è specifica dei malati di Alzheimer. A tal proposito è bene evidenziare che la proteina precursore della sostanza amiloide viene sintetizzata anche in altri organi, perciò non si riesce a dare una spiegazione del perché solo nel cervello dia vita a depositi diffusi di materiale extracellulare. Il problema, in sostanza, è se le placche di beta amiloide siano effettivamente la causa della demenza e questa domanda fondamentale quanto irrisolta è da anni al centro delle discussioni e della ricerca. In questo contesto è di particolare rilievo un recente studio condotto dai ricercatori del CNR di Pisa secondo cui ancor prima che si formino le placche, la sostanza beta-amiloide si lega ad una proteina presente sulla superficie delle cellule nervose chiamata RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) provocando disturbi cognitivi di apprendimento e memoria tipici della malattia. Ciò ha avviato nuovi studi allo scopo di identificare anticorpi per bloccare l'attività della proteina RAGE (Origlia et al., 2009).

Ulteriori studi mettono in evidenza che nei malati di Alzheimer interviene un ulteriore meccanismo patologico: all'interno dei neuroni, una proteina tau, fosforilata in maniera anomala, si accumula in aggregati neurofibrillari o ammassi neurofibrillari (NFT). La proteina tau ha la funzione di stabilizzare lo scheletro dell'assone, legando tra loro i microtubuli che lo costituiscono. Se essa viene iperfosforilata la sua capacità di interagire con i microtubuli diminuisce ed aumenta invece la sua capacità di auto associarsi, formando doppi filamenti elicoidali che si accumulano in matasse nel corpo cellulare costituendo aggregati anomali. Ciò porta al collasso della struttura microtubulare e ad una conseguente riduzione del trasporto assonale e quindi degenerazione neuronale (Figura 11). Tale anomala aggregazione si osserva anche nel cervello di persone sane e di soggetti affetti da altre forme di demenza. Particolarmente colpiti da questo processo patologico sono i neuroni di grandi dimensioni come quelli presenti nell'ippocampo, corteccia olfattiva, amigdala, nuclei del proencefalo basale e parecchi nuclei del tronco. In particolare l'ippocampo interviene nell'apprendimento e nei processi di memorizzazione perciò la distruzione dei neuroni di queste zone è ritenuta essere la causa della perdita di memoria dei malati. L'anormale fosforilazione è stata attribuita all'attività fosforilasi dell'enzima glicogeno sintasi chinasi 3 o GSK3 (Glycogen Synthase Kinase3) e alla capacità della beta-amiloide di determinare un incremento della concentrazione intracellulare del calcio. Questo renderebbe la cellula più sensibile a neurotrasmettitori eccitatori come il glutammato con conseguente ipereccitazione dei recettori di membrana del glutammato e attivazione delle chinasi calcio-dipendenti con alterata fosforilazione della proteina tau e successiva formazione di grovigli neurofibrillari

(Phiel et al., 2003). Non è chiaro se i grovigli rappresentino una causa o una conseguenza della neurodegenerazione che si osserva nella malattia di Alzheimer e mutazioni del gene che codifica per Tau non sono associate a forme ereditarie di Alzheimer. In Figura 12, nel confronto tra cellule neuronali di soggetti sani e patologici, si evidenzia come gli aggregati neuro fibrillari siano posti all'interno del neurone stesso, al contrario delle placche amiloidee che si trovano invece nella zona extracellulare.

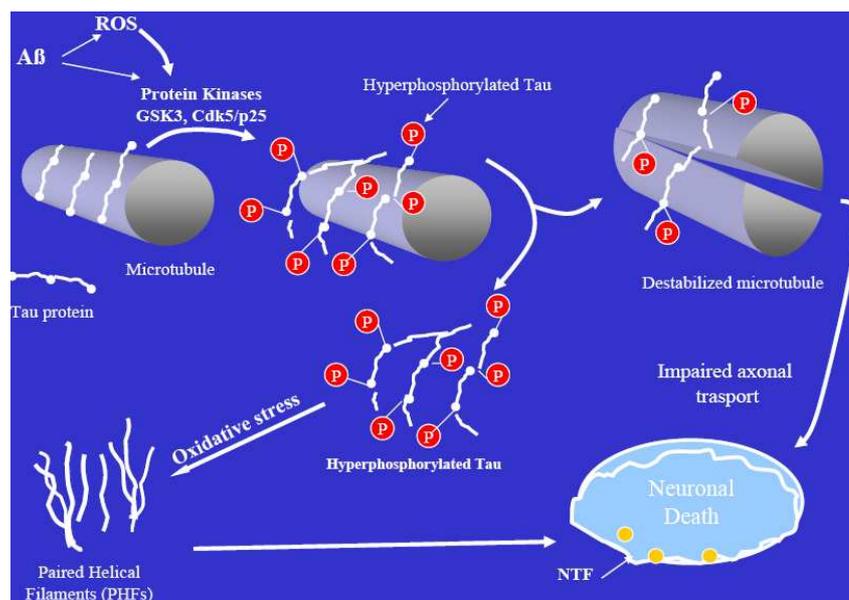


Figura 11. Processo di formazione degli aggregati neuro fibrillari (NFT).

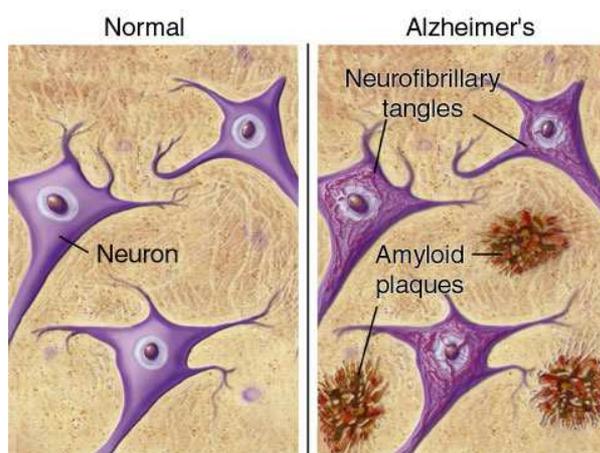


Figura 12. Confronto tra neuroni di soggetti sani e patologici.

Oltre a ciò, nel cervello si assiste ad una forte diminuzione della sintesi e del rilascio di neurotrasmettitori, in particolar modo della acetilcolina, un neurotrasmettitore legato direttamente alla funzione della memoria e ad altre funzioni intellettive. I neuroni, quindi, non sono più in grado di trasmettere correttamente gli impulsi nervosi: da qui nascono i

sintomi caratteristici della malattia, come perdita della memoria e difficoltà di linguaggio. Probabile causa della diminuzione di acetilcolina è una degenerazione a carico del nucleo basale di Meynert, un'importante struttura implicata nel circuito della memoria per le sue connessioni e proiezioni colinergiche che raggiungono la corteccia, l'ippocampo, l'amigdala, il bulbo olfattivo, il talamo e il tronco dell'encefalo. Altri sistemi neurotrasmettitoriali, quali somatostatina, vasopressina, CRF (corticotropin-releasing factor), serotonina, dopamina, risultano alterati nell'Alzheimer, sebbene il loro esatto ruolo nella patogenesi della malattia non sia del tutto chiarito. Anche nei soggetti anziani si può riscontrare una riduzione dei neurotrasmettitori in determinate zone cerebrali, segno di spopolamento neuronale, ma la concentrazione dei metaboliti di tali neurotrasmettitori non è però inferiore a quella dei giovani. Questo significa che nei soggetti anziani che non presentano disturbi cognitivi esistono dei meccanismi di compenso. Questo meccanismo di compenso è assente nei soggetti affetti da demenza di Alzheimer in cui vi è una riduzione anche dei metaboliti di tutti i principali neurotrasmettitori (Linee Guida- Emilia Romagna).

Nei pazienti affetti da Alzheimer vi è sovente una pronunciata atrofia corticale (Mouton et al.,1998), un'evidente assottigliamento della sostanza grigia dovuta a perdita neuronale (Figura 13). Più colpite sono generalmente il lobo frontale, la parte anteriore del lobo temporale e il lobo parietale, l'ippocampo, le aree limbiche ed il nucleo basale di Meynert:

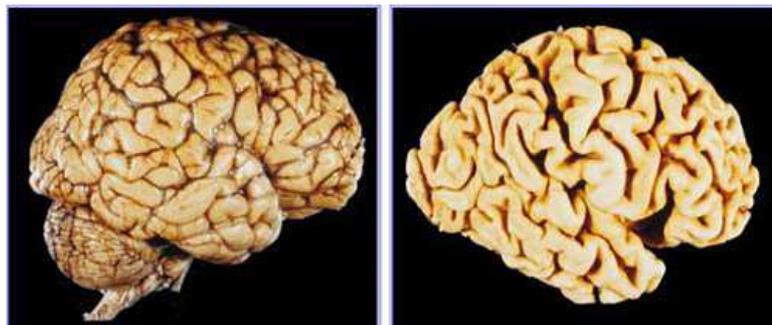


Figura 13. Confronto tra la corteccia di pazienti sani (sinistra) e affetti da Alzheimer (destra).

Nel cervello di individui affetti da Alzheimer si riscontra anche degenerazione delle strutture sinaptiche (Querfurth, LaFerla, 2010): vi è una diminuzione del numero di sinapsi, e carenza di sostanze proteiche presenti nelle sinapsi di cellule sane. La degenerazione ha una buona correlazione con il decorso e l'entità della malattia. I sintomi demenziali potrebbero dunque essere interpretati come conseguenza del deficit sinaptico, in quanto i neuroni hanno difficoltà nel comunicare.

1.3.3 Cause della Malattia

L'AD nel 90% e più dei casi non ha origine genetica, anche se ci può essere una certa predisposizione per cui in famiglie in cui ci sono casi di AD relativamente precoci è più probabile che altri membri della famiglia sviluppino la malattia. Avvalorano questa ipotesi studi epidemiologici secondo cui le donne risultano essere più esposte all'Alzheimer e studi condotti sui gemelli, che evidenziano quanto sia più frequente che gemelli monozigoti siano colpiti entrambi dalla malattia rispetto ai gemelli dizigoti, nei quali il patrimonio genetico non è identico. Si può dunque fare un'importante distinzione fra le forme di Alzheimer sporadiche e quelle familiari (Tabella 2). Le forme sporadiche sono la maggioranza (circa il 90%) e sono quelle in cui la malattia colpisce un solo membro di una famiglia, oltre o prima dei 65 anni (esordio tardivo o precoce, detto anche senile o presenile). Nelle forme familiari (il restante 10% dei casi) più persone sono invece colpite nella stessa famiglia. Le forme familiari si possono a loro volta suddividere in forma tardiva familiare (AD2) che si diagnostica nelle famiglie con più casi di malattia che si manifestano dopo i 60 anni e forme precoci familiari (AD1, AD3, AD4) che si diagnosticano nelle famiglie con più casi della malattia che si manifestano prima dei 60 anni. Sono forme più rare nell'ambito delle quali prende maggiormente piede l'ipotesi genetica dell'origine della malattia, per cui sebbene siano meno importanti dal punto di vista epidemiologico perchè rappresentano una minoranza, vengono studiate al fine di comprendere importanti informazioni sul meccanismo di insorgenza della malattia (Janssen et al., 2003). Tutte le mutazioni genetiche che causano AD familiare sono associate ad un aumento selettivo del peptide A β 42 o del livello generale di beta-amiloide. Il primo gene identificato come responsabile dell'esordio precoce AD1 (35-50 anni) è sito sul cromosoma 21 e codifica per la proteina precursore della beta-amiloide (beta-APP) aumentando la produzione di beta-amiloide totale e delle sue forme in particolar modo di quella tossica. La mutazione di questo gene è responsabile di non più del 5% dei casi di AD. Le mutazioni a carico dell'APP sono localizzate in prossimità dei siti di taglio del livello degli aminoacidi 670–671, favorendo il taglio β -secretasico, conducono ad un aumento della produzione di beta-amiloide totale di circa 8 volte; la mutazione in posizione 712 inibisce il taglio α secretasico, favorendo la produzione di β A; mutazioni ai codoni 716, 717 e 723 favoriscono il taglio γ -secretasico in posizione 42 o 43; Le preseniline (Figura 14) sono proteine che hanno la funzione di tagliare la proteina amiloide, per questo un'ipotesi è che il loro alterato funzionamento potrebbe portarne l'accumulo (Howard e Filley, 2009; Wang e Ding, 2008; Hoenicka, 2006). Il gene della presenilina 1 (PSEN1) localizzato nel

cromosoma 14, risulta alterato nella forma AD3. In particolare oltre 150 diverse mutazioni di questo gene sono state finora identificate in pazienti con forme familiari ad esordio precoce. Queste mutazioni rappresentano la causa più comune (70%) di origine genetica della malattia di Alzheimer familiare ad esordio precoce (28-60 anni). Dati molto recenti dimostrano che le preseniline sono in grado di aumentare l'attività proteasica della gamma-secretasi e quindi di beta-amiloide e secondo alcuni autori sarebbero esse stesse delle gamma-secretasi (Selkoe, 1999; Soto, 1999; Haass e De Strooper, 1999). Più rare sono le mutazioni del gene della presenilina 2 (PSEN2) localizzato nel cromosoma 1, correlato alla forma AD4. Fino ad oggi solo 10 mutazioni della presenilina 2 sono state identificate in pazienti appartenenti a famiglie americane originarie dell'Europa dell'est ed in una famiglia italiana del nord-est. In queste famiglie l'età di esordio può essere precoce (30 anni) ma anche molto tardiva (oltre 80). Tali modifiche da una parte accelererebbero l'apoptosi delle cellule cerebrali, cioè la loro "morte programmata", rendendole più sensibili all'attacco della beta amiloide, dall'altra, provocherebbero una maggiore produzione della proteina stessa come risposta allo stress. Studi recenti hanno evidenziato che sia per le forme familiari che per quelle sporadiche, vi è un altro gene correlato con la malattia, una variante polimorfica del gene che codifica per la ApolipoproteinaE localizzato a livello del cromosoma 19 (denominata ApoE-e4) presente nel 15% della popolazione sana ma nel 50% della popolazione affetta da Alzheimer. L'ApoE (apolipoproteina E) è una proteina plasmatica, coinvolta nel trasporto del colesterolo e sua distribuzione nei processi di riparazione delle membrane neuronali. Esistono tre forme di apolipoproteina E: ApoE2, ApoE3, ApoE4, codificate da tre diversi alleli (E2, E3, E4). Diversi studi (Corder et al., 1993) hanno mostrato che l'allele 4 (E4) è più frequente nelle persone affette da Alzheimer rispetto a quelle sane; la presenza del genotipo E4/E4 determinerebbe un aumento di circa tre volte il rischio di sviluppare la malattia nelle forme ad esordio tardivo, familiari e sporadiche. In realtà l'ApoE aumenta notevolmente la degradazione della proteina beta amiloide ma la capacità di svolgere questa degradazione varia in maniera sostanziale fra le diverse isoforme della ApoE, così mentre le isoforme ApoE2 e ApoE3 avrebbero un effetto protettivo nei confronti della malattia, l'isoforma ApoE4 mostra un deficit nella capacità di sostenere tale processo. Analisi condotte in vitro hanno evidenziato che questa particolare isoforma facilita la formazione del nocciolo iniziale della placca e successivamente facilita l'aggregarsi delle molecole di beta-A4 a tale nocciolo poiché è fortemente affine al peptide stesso (Strittmatter et al., 1993). La genotipizzazione dell'ApoE, tuttavia, fornisce un dato solamente indicativo, cioè di predisposizione e che non basta da solo a stabilire la diagnosi: infatti, quasi la metà delle persone affette da AD non

possiede questo allele, che d'altra parte può essere presente anche in una discreta percentuale di persone sane.

Tra gli svariati studi che si stanno conducendo sulla componente genetica dell'AD, degna di nota è la scoperta del gene codificante per la Nicastrina (Figura 14), il cui nome è dovuto alla città calabrese di Nicastro, di cui erano originarie le persone oggetto, ben 40 anni fa, del primo studio genetico sulla forma familiare dell'AD (Yu et al., 2000). Studiando infatti le forme genetiche di AD ad esordio precoce, si è isolato un gene coinvolto, localizzato sul cromosoma 1; questo codifica per una glicoproteina delle membrane neuronali, che appartiene al gruppo delle preseniline la nicastrina. Per spiegare la funzione della nicastrina sono stati ipotizzati due modelli molecolari: il primo attribuisce alla nicastrina un ruolo nel legare i substrati nel complesso preseniline/ γ -secretasi, il secondo, invece, vede la nicastrina come possibile regolatore dell'attività della γ -secretasi. Nelle forme mutate la nicastrina potrebbe essere causa di alcune forme di Alzheimer, aumentando la secrezione dei peptidi A β 40 ed A β 42. E' importante sottolineare che l'ipotesi genetica è in fase di studio ed approfondimento e che attualmente nessun marcatore genetico è utile come test diagnostico o per effettuare screening di popolazione predittivi della malattia.

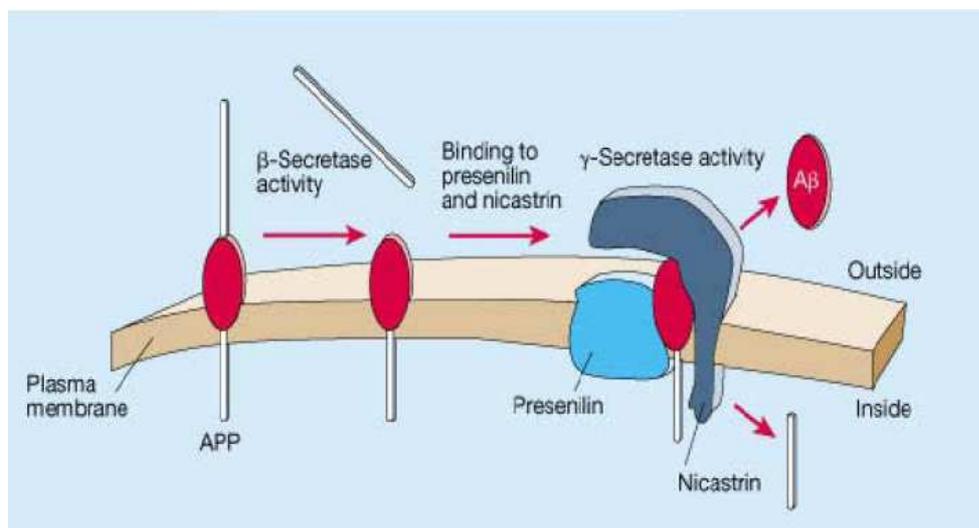


Figura 14. Complessi enzimatici coinvolti nella produzione di beta-amiloide.

Tabella 2. Confronto tra forme familiari e sporadiche.

Forme Familiari (5-10%)	Forme Sporadiche (90-95%)
Esordio precoce (< 60 anni) = EOFAD (Early Onset Family Alzheimer Disease)	Esordio precoce (< 65 anni) = EOAD (Early Onset Alzheimer Disease)
Esordio tardivo (> 60 anni) = LOFAD ((Early Onset Family Alzheimer Disease)	Esordio tardivo (> 65 anni) = LOAD (Late Onset Alzheimer Disease)
Fattori genetici	Fattori genetici Fattori non genetici

Oltre alle suddette cause genetiche, altre ipotesi sono correlate all'esordio della malattia di Alzheimer: una concentrazione intraneuronale di alluminio (che tende ad accumularsi all'interno delle placche senili sotto forma di silicato) significativamente più elevata nei pazienti con AD, rispetto ai controlli non affetti da tale malattia fa pensare ad una possibile origine neurotossica della patologia; una più marcata alterazione delle risposte immunitarie, nei soggetti affetti da AD rispetto ai controlli sani, sembra indicare un coinvolgimento del sistema immunitario nell'eziologia della AD. E' stata proposta anche un'ipotesi basata sull'alterata permeabilità della barriera emato-encefalica che permetterebbe a sostanze tossiche (ad es., auto-anticorpi contro i neuroni che producono acetilcolina) di entrare nel SNC e di attaccare i neuroni. Studi epidemiologici caso-controllo hanno dimostrato un più alto rischio di sviluppare AD, nei soggetti che hanno subito gravi traumi cranici. Data la vicinanza delle strutture limbiche e dell'ippocampo che risultano particolarmente colpite, con il rinencefalo, alcuni autori hanno proposto che le matasse siano dovute a agenti virali che si introducono dai recettori olfattivi (ipotesi virale). E' stato anche dimostrato che ripetuti traumi cranici possono provocare alterazioni tissutali del tipo della degenerazione neurofibrillare, la cosiddetta "punch-drunk syndrome". Inoltre, sono state evidenziate, già in fasi precoci della malattia, riduzione della perfusione ematica a livello della corteccia temporo-parietale ed asimmetrie lesionali. Ulteriori fattori etiopatogenetici dell'AD sono stati riconosciuti in patologie tiroidee, carenze dietetiche e fattori vascolari.

1.3.4 Fattori di Rischio e Fattori Protettivi

Si definiscono fattori di rischio le condizioni e le caratteristiche dello stile di vita la cui presenza favorisce ma non determina, con meccanismo causa-effetto, la comparsa di una malattia. La loro correzione o rimozione consente di prevenire l'insorgere della malattia prima che questa si manifesti. Nel caso delle malattie cardiocircolatorie, come l'aterosclerosi, sono stati individuati più di 200 fattori di rischio come la sedentarietà, l'eccessivo consumo di grassi, il fumo di sigaretta, l'ipertensione arteriosa e l'obesità, solo per citarne alcuni. Nel caso della malattia di Alzheimer, invece, non si è ancora giunti all'individuazione di ben determinati fattori di rischio poiché molti sono gli imputati, ma poche sono le prove e gli indizi che consentono con sicurezza di fornire indicazioni preventive efficaci. E' possibile tuttavia, differenziare tali fattori in due categorie: fattori di rischio certi (per i quali è stata provata l'associazione con la malattia),

e fattori di rischio possibili (per i quali invece, esiste una forte ma non costante associazione con la malattia).

Tra i fattori di rischio certi vi sono l'età, che rappresenta sicuramente il fattore di rischio più rilevante per le demenze, inclusa la malattia di Alzheimer, dal momento che la probabilità di contrarre la malattia aumenta in modo esponenziale con l'età, ma anche fattori familiari e genetici.

I fattori possibili includono invece i traumi cranici, studiati da Graves che ha dimostrato che esiste una forte associazione causa-effetto fra trauma cranico e malattia di Alzheimer, poiché il trauma cranico accelerando la produzione di amiloide, determina lo sviluppo della malattia dementigena; fattori vascolari in quanto diversi studi recenti suggeriscono che soggetti esposti a fattori di rischio vascolare e soggetti che hanno avuto un infarto miocardico, hanno una maggior probabilità di sviluppare la malattia. A tal proposito si ritiene che il meccanismo che porta alla produzione di amiloide si attivi in seguito ad un evento ipossico, in quanto la proteina precursore dell'amiloide, contiene elementi promotori che si attivano in caso di trauma o ipossia; sindrome di Down, malattia genetica dovuta ad una mutazione del gene localizzato in una particolare posizione del cromosoma 21 che si trova nelle immediate vicinanze del cromosoma responsabile dell'insorgenza precoce della malattia di Alzheimer. Il collegamento tra la sindrome di Down e la demenza di tipo Alzheimer sta nel fatto che la mutazione può coinvolgere l'intero segmento che riguarda i due geni e perciò le persone che presentano la prima delle due mutazioni, sono più a rischio delle altre di avere anche la seconda; basso livello di istruzione anche se a tutt'oggi non è ancora stato chiarito il ruolo ricoperto dall'istruzione, ma è indubbio che la mancanza di attività mentale precoce, può condurre a un prematuro impoverimento della densità sinaptica e permettere quindi ai sintomi clinici della malattia di manifestarsi prima rispetto ai soggetti con un livello culturale più elevato e l'aver svolto un lavoro prevalentemente manuale e ripetitivo nel corso della vita è stato ipotizzato come fattore di rischio per demenza; anche la depressione aumenta moderatamente il rischio di malattia di circa tre volte, tuttavia rimane da determinare se, almeno in alcuni casi, la depressione possa rappresentare un sintomo precoce di malattia di Alzheimer.

In realtà sono stati anche individuati possibili fattori protettivi tra i quali rivestono un ruolo significativo gli estrogeni e gli antinfiammatori. In particolare alcuni studi epidemiologici (Correa et al., 2010) hanno dimostrato che, nelle donne che avevano assunto estrogeni dopo la menopausa, il rischio di contrarre la malattia di Alzheimer era minore rispetto alle altre. Sono stati ipotizzati vari meccanismi attraverso i quali gli estrogeni

possono migliorare la performance cognitiva: aumento dell'attività dell'acetilcolino-transferasi, stimolazione della rigenerazione neuronale e regolazione della funzione sinaptica a medio-lungo termine. Inoltre sembra che gli estrogeni siano coinvolti nella riduzione della produzione dell'ApoE e migliorino l'efficienza dei trattamenti farmacologici nelle forme lievi e moderate di malattia di Alzheimer. Anche un'altra famiglia di farmaci, gli antinfiammatori, sembra essere coinvolta nella riduzione del rischio di sviluppare la malattia. Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che soggetti affetti da artrite reumatoide, che assumono quotidianamente FANS (farmaci antiinfiammatori non steroidei) l'incidenza della malattia di Alzheimer è più bassa rispetto al resto della popolazione. Controversa appare invece la questione inerente il fumo, poiché alcuni studi riportano un'associazione negativa tra il fumo e la malattia di Alzheimer, altri invece non hanno rivelato alcuna associazione tra i due, sottolineando l'effetto nocivo del fumo sull'apparato cardiovascolare e respiratorio. Secondo alcuni (Loperz et al., 2000) il ruolo protettivo della nicotina si traduce in una up-regulation dei recettori nicotinici dell'acetilcolina con possibile effetto positivo sulle funzioni cognitive; questa ipotesi è stata suggerita da studi sperimentali, i quali asseriscono che sostanze in grado di stimolare i recettori nicotinici migliorano l'apprendimento e la memoria in vari modelli animali di deficit cognitivo. Ovviamente è lontana l'idea di suggerire a un malato di Alzheimer di fumare poiché se da un lato le sue performance cognitive potrebbero in qualche modo migliorare, dall'altro l'effetto negativo del fumo è noto a tutti, rappresentando la prima causa di morte prematura nei paesi industrializzati. È stato riportato in numerosi studi in diversi paesi un effetto protettivo esercitato dall'istruzione che aumenta la capacità del cervello di rispondere a differenti insulti patogeni e che consente di captare meglio anche le informazioni sulle possibilità di prevenzione e di metterle di conseguenza in atto. Secondo due nuovi studi, il consumo di alimenti ricchi di vitamine C ed E (potenti antiossidanti), potrebbe ridurre il rischio di Alzheimer. A testare le proprietà antidemenza della vitamina C, contenuta in frutta e verdura fresche, sono stati i ricercatori dell'Erasmus Medical Center di Rotterdam. Inoltre un'attività fisica e regolare non solo mantiene in forma il nostro corpo, ma aiuta a prevenire il declino mentale e ad allontanare l'Alzheimer. Ricercatori canadesi hanno dimostrato che i pazienti che facevano più esercizio fisico, in particolare le donne, mantenevano inalterate le capacità mentali e svilupparono meno frequentemente demenza o Alzheimer.

1.4 Demenza Vascolare

La demenza associata a Malattia cerebrovascolare (VD) secondo gli studi epidemiologici aumenta percentualmente con l'età, passando dall'1,5% fra 75 e 79 anni a oltre il 16% dopo gli 80 anni. In uno studio italiano, la demenza vascolare sembra più prevalente dell'Alzheimer nei soggetti di 70 anni e oltre. Demenza vascolare è il termine generale per la demenza associata con problemi di circolazione del sangue nel cervello ma la sua definizione è tutt'ora molto controversa. Ad oggi sono infatti conosciute diverse forme di demenza vascolare (Bianchetti e Metitieri, 1999; Roman, 2004):

Demenza multi-infartuale (MID), la più frequente e originariamente considerata l'unica forma di demenza vascolare, caratterizzata da infarti grandi, completi e multipli, in genere dovuti all'occlusione di grossi vasi sottocorticali e corticali.

Demenza da infarti singoli "strategici", (SID) una forma abbastanza rara caratterizzata da piccole lesioni ischemiche localizzate in aree corticali e sottocorticali funzionalmente importanti come il talamo e la regione temporale.

Demenza in corso di malattia dei piccoli vasi con lesioni provocate dalla malattia dei piccoli vasi corticali o sottocorticali. Queste ultime possono essere lacune (malattia di Binswanger) o lesioni della sostanza bianca che frequentemente si osservano anche in cervelli di soggetti anziani normali.

Demenza da ipoperfusione che può conseguire ad una prolungata ischemia cerebrale globale, secondaria ad arresto cardiaco o a ipotensione profonda, o a un'ischemia localizzata in territori spartiacque, che comprendono la sostanza bianca periventricolare ma anche gangli della base ed ippocampo.

Demenza post-emorragica causata da lesioni emorragiche, compresi l'ematoma subdurale cronico, le sequele di un'emorragia subaracnoidea, l'ematoma cerebrale (frequentemente associato, nell'anziano, ad angiopatia amiloidea).

Altri meccanismi in cui una combinazione dei fattori sopra indicati o qualche altro fattore non ancora conosciuto, possono giocare un ruolo nella patogenesi della VD.

Reputato il più frequente e quello più omogeneo dal punto di vista fisiopatologico, il gruppo delle demenze vascolari sottocorticali è stato proposto quale patologia su cui concentrare gli sforzi terapeutici e particolare attenzione si sta focalizzando (Roman et al, 2004; Erkinjuntti e Gauthier, 2009) su una categoria preclinica indicata con il termine *Deterioramento cognitivo su base Vascolare (VIC)*, introdotta da Hachinski e rivistata anche dal gruppo del *Canadian Study of Health and Aging*, che include quei pazienti che

presentano alterazioni cognitive da danno vascolare cerebrale, ma che non soddisfano i criteri necessari per fare diagnosi di demenza. Esso individua un ampio spettro di disfunzione cognitiva che va dalla compromissione cognitiva lieve (MCI) subclinica alla demenza vascolare conclamata. Ciò al fine di individuare casi di VD nella fase precoce, momento teoreticamente "migliore" per un eventuale intervento terapeutico.

Fattori di rischio (Bianchetti e Metitieri, 1999; Roman, 2005) per l'insorgenza di una demenza vascolare sono : età avanzata, ictus, coronaropatie, ipertensione, fibrillazione atriale, diabete, fumo, iperlipemia, ematocrito elevato, iperomocisteinemia, alterazioni emostasi, stress in età evolutiva, basso livello di scolarità ed esposizione a sostanze tossiche.

1.4.1 MID : sintomi

L'esordio della MID può essere improvviso poichè possono verificarsi molti infarti prima che appaiano dei sintomi. Il decorso, differentemente dalle demenze degenerative di tipo Alzheimer, è discontinuo con un tipico andamento a gradini in cui vi è un miglioramento, una stabilizzazione e un successivo improvviso peggioramento causato da un nuovo evento ischemico. Talvolta, tuttavia, le fluttuazioni sono così poco evidenti che il declino può apparire graduale complicando la diagnosi. Spesso infatti, specialmente all'inizio, è difficile distinguere le demenze vascolari dalla demenza Alzheimer sulla sola base dei sintomi neuropsicologici, tuttavia vi sono delle caratteristiche comportamentali che le distinguono. I problemi di memoria sono spesso il primo sintomo di demenza vascolare, in genere questi pazienti hanno una compromissione della memoria recente, ovvero sono incapaci di ricordare fatti recenti e avvenimenti accaduti dopo l'ictus. I deficit di memoria di questi pazienti non sono chiaramente distinguibili da quelli riscontrabili in pazienti affetti da sindrome di Alzheimer, sebbene nei soggetti con demenza vascolare siano sostanzialmente mantenute la memoria episodica e remota e la capacità di apprendere nuove informazioni. Inoltre i pazienti con demenza vascolare hanno minori problemi con la rievocazione libera, ma hanno difficoltà nel seguire le istruzioni. Dal momento che l'infarto cerebrale colpisce parti distinte del cervello, i deficit delle funzioni cognitive correlano con il sito e l'estensione dell'infarto e per questo, a differenza della malattia di Alzheimer, sono meno uniformi e alcune funzioni possono rimanere intatte. L'occlusione dell'arteria cerebrale posteriore provoca problemi di memoria, allucinazioni visive, deficit visivi e confusione, l'occlusione dell'arteria cerebrale media causa invece afasia sensoriale (comprensione del linguaggio), disturbi visuo-spaziali e deficit motori, mentre l'occlusione dell'arteria cerebrale anteriore

determina afasia motoria (espressione del linguaggio scritta, e parlate) agnosia ed aprassia. Essendo anche espressione di un disturbo sottocorticale, tra i sintomi caratteristici della MID vi sono disturbi dell'andatura e instabilità posturale che insieme ai problemi amnesici rappresentano i sintomi iniziali della patologia. Spesso in questi pazienti si riscontra una pregressa storia di instabilità con frequenti cadute. I disturbi della marcia sono tra i sintomi d'elezione per poter fare una diagnosi differenziale tra demenza vascolare e demenza Alzheimer, come anche la pollachiuria, ossia l'aumento del numero delle minzioni nell'arco delle 24 ore e l'incontinenza urinaria (Roman, 2004). Si ha inoltre compromissione delle funzioni del lobo frontale (deficit di pianificazione, iniziativa, organizzare, astrarre, mettere in sequenza), deficit di concentrazione e di attenzione. Le modificazioni della personalità che intervengono con la demenza vascolare sono in genere meno gravi di quelle conseguenti a demenza di tipo Alzheimer. Per quanto riguarda le modificazioni dell'umore, i pazienti con demenza vascolare mostrano una spiccata labilità emotiva frequentemente con sintomatologia depressiva, rallentamento psicomotorio, della parola e dei movimenti corporei. La sopravvivenza dei pazienti affetti da MID è risultata in alcuni studi inferiore a quella dei pazienti affetti da AD (il 50% di sopravvivenza dall'inizio della malattia è stato ottenuto rispettivamente dopo 6 e 8 anni).

1.4.2 Diagnosi

Riconoscere e classificare correttamente una demenza è una delle operazioni di diagnosi clinica più delicate che ci possano essere, perché essa si presenta con una ampia variabilità di quadri clinici tanto che anche all'interno della stessa condizione etiologica (ad esempio la malattia di Alzheimer) può esservi una certa eterogeneità. Ciò perché le manifestazioni cliniche della demenza nel singolo paziente dipendono dall'interazione fra danno neurobiologico e numerose altre variabili come la personalità, la storia personale (livello educativo e culturale), stato globale di salute, situazione familiare e sociale, cosa che rende ogni paziente un unicum, magari simile, ma mai identico a nessun altro (Linee guida-Emilia Romagna).

Indipendentemente da tali problematiche, la diagnosi di demenza deve essere effettuata seguendo le indicazioni dei criteri accettati a livello internazionale (Sciarra e Felicioni, 2009): per l'Alzheimer i più usati sono i criteri del DSM-IV TR e i criteri specifici del NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, mentre per la

demenza vascolare si ricorre a più criteri diagnostici DSM-IV TR, ICD-10, ADDTC (Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers) e quelli più specifici del NINDS-AIREN (National Institute for Neurological Disorders and Stroke - Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences).

Criteri per la diagnosi di AD secondo il DMS IV TR :

- A Criteri per DMS IV TR per la diagnosi di demenza;
- B Il decorso è caratterizzato da insorgenza graduale e declino continuo delle facoltà cognitive.
- C. I deficit cognitivi dei criteri non sono dovuti ad alcuno dei seguenti fattori:
 - 1. altre condizioni del sistema nervoso centrale che causano deficit progressivi della memoria e delle facoltà cognitive (per esempio, malattia cerebrovascolare, malattia di Parkinson, malattia di Huntington, ematoma subdurale, idrocefalo nonnoteso, tumore cerebrale);
 - 2. affezioni sistemiche che sono riconosciute come causa di demenza (per esempio, ipotiroidismo, deficit di vitamina B12 o acido folico, deficit di Magnesio, ipercalcemia, la neurosfilide, infezione HIV);
 - 3. affezioni indotte da sostanze.
- D. Il disturbo non risulta meglio giustificato da un altro disturbo dell'Asse I (per esempio, Disturbo Depressivo Maggiore, Schizofrenia).
Con insorgenza Precoce: se l'insorgenza è all'età di 65 anni o prima.
Con insorgenza Tardiva: se (insorgenza è dopo 65 anni di età)
Con Delirio: se i deliri sono la caratteristica dominante.
Con Umore Depresso: l'umore depresso (inclusi i quadri che soddisfano pienamente i criteri sintomatologici per Episodio Depressivo Maggiore) è la caratteristica dominante. Non complicato: se nessuno dei sottotipi sopra ripostati predomina nel quadro clinico attuale.
Specificare se: Con Alterazioni Comportamentali.

La diagnosi di AD secondo il NINCDS-ADRDA

I. Criteri per la diagnosi clinica di *malattia di Alzheimer* **PROBABILE**:

- 1. Demenza stabilita dall'esame clinico e documentata dal Mini Mental Test, dalla Blessed Dementia Scale, o da esami similari, e confermata da tests neuropsicologici
- 2. Deficit di due o più aree cognitive
- 3. Peggioramento progressivo della memoria e di altre funzioni cognitive
- 4. Assenza di disturbi della coscienza
- 5. Esordio tra i 40 ed i 90 anni, più spesso dopo i 65
- 6. Assenza di patologie sistemiche o di altre malattie cerebrali responsabili di deficit cognitivi e mnesici progressivi

II. La diagnosi di *malattia di Alzheimer* **PROBABILE** è suffragata da:

- 1. Deterioramento progressivo di funzioni cognitive specifiche quali il linguaggio (afasia), la gestualità (aprassia), e la percezione (agnosia)
- 2. Compromissione delle attività quotidiane e del "pattern" di comportamento
- 3. Familiarità positiva per analoghi disturbi, particolarmente se confermati dal punto di vista neuropatologico
- 4. Conferme strumentali di:
 - normalità dei reperti liquorali standard
 - normalità o aspecificità dell'EEG
 - atrofia cerebrale alla TAC cerebrale con documentata progressione dopo osservazioni seriate

III. Altre caratteristiche cliniche in accordo con la diagnosi di *malattia di Alzheimer* **PROBABILE** includono, dopo l'esclusione di cause alternative di demenza:

- 1. "Plateau" nella progressione della malattia
- 2. Associazione di depressione, insonnia, incontinenza sfinterica, disturbi della percezione, reazioni verbali emotive o fisiche di tipo catastrofico, disturbi sessuali, calo ponderale

3. Altre anomalie neurologiche, specialmente nei casi con malattia in fase avanzata, comprendenti segni motori quali ipertono, mioclonie o disturbi della marcia
4. Crisi epilettiche nella malattia in fase avanzata
5. TAC encefalica normale per l'età

IV Caratteristiche che rendono la diagnosi di *malattia di Alzheimer* *PROBABILE* incerta:

1. Esordio acuto, apoplettiforme
2. Presenza di segni neurologici focali quali emiparesi, deficit sensitivi, alterazioni campimetriche ed incoordinazione nelle fasi precoci della malattia
3. Crisi o disturbi della marcia all'esordio o nelle fasi iniziali del decorso della malattia

V La diagnosi clinica di *malattia di Alzheimer* *POSSIBILE*:

1. Può essere formulata sulla base di una sindrome demenziale, in assenza di disturbi neurologici, psichiatrici o sistemici in grado di causare demenza, e in presenza di variazioni dell'esordio, delle modalità di presentazione o del decorso
2. Può essere formulata in presenza di una patologia neurologica o sistemica concomitante, possibilmente responsabile di demenza, non considerata tuttavia la vera causa della demenza
3. Dovrebbe essere utilizzata nella ricerca quando un deficit cognitivo isolato, progressivo e grave sia evidenziabile in assenza di altre cause identificabili

VI I criteri per la diagnosi di *malattia di Alzheimer* *DEFINITIVA* sono:

1. I criteri clinici di malattia di Alzheimer *PROBABILE* e
2. documentazioni neuropatologiche biotiche o autoptiche.

Criteri per la diagnosi di VaD secondo il DSM-IV TR:

A. Criteri DSM – IV per la diagnosi di demenza.

B. Presenza di segni e sintomi neurologici focali (esagerazione dei riflessi tendinei profondi, stimolazione cutanea plantare positiva, paralisi pseudobulbare, disturbi della deambulazione, deficit di forza a una estremità) oppure referti strumentali indicativi della presenza di malattia cerebrovascolare (infarti multipli che interessano le aree corticali o la sostanza bianca) ritenuti eziologicamente correlati con i deficit.

Sulla base delle caratteristiche cliniche predominanti si distinguono:

1. con delirium
2. con deliri
3. con depressione
4. non complicata

Criteri per la diagnosi di VaD secondo il ICD-10:

A. Criteri ICD-10 per la diagnosi di demenza.

B. Distribuzione ineguale dei deficit cognitivi

C. Evidenza di danno cerebrale focale che si manifesta con almeno uno dei seguenti: paralisi spastica degli arti, aumento unilaterale dei riflessi osteotendinei, riflesso plantare in estensione, paralisi pseudobulbare);

D. Evidenza dalla storia, esame obiettivo o dagli esami di malattia cerebrovascolare significativa che possa essere ragionevolmente giudicata in relazione alla demenza.

Criteri per la diagnosi di VaD secondo l'ADDTC:

Demenza Vascolare Probabile:

- 1) Evidenza clinica di demenza;
- 2) Evidenza di due o più ictus ischemici (anamnesi, esame neurologico, imaging) o di un singolo ictus con una chiara e documentata relazione temporale con l'esordio della demenza;
- 3) Evidenza di almeno un infarto al di fuori del cervelletto (TAC, RMN).

Demenza Vascolare possibile:

- 1) Evidenza clinica di demenza ed uno o più dei seguenti:
- 2a) Evidenza di un singolo ictus senza una chiara e documentata relazione temporale con l'esordio della demenza o,
- 2b) Malattia di Binswanger, che include tutti i seguenti:

- a) Incontinenza precoce o disturbi dell'equilibrio,
- b) Fattori di rischio vascolari,
- c) Alterazioni della sostanza bianca (WMLs) al neuroimaging.

Demenza Vascolare certa :

- 1) Evidenza clinica di demenza;
- 2) Evidenza anatomopatologica di almeno un infarto al di fuori del cervelletto.

Criteri NINDS-AIREN per la diagnosi di VaD

Definizione di demenza vascolare (VaD)

Requisiti di base:

- 1) presenza di demenza (secondo i criteri DSM-III-R, DSM-IV o ICD-10);
- 2) evidenza di malattia cerebrovascolare dimostrata o dalla storia del paziente o dall'esame clinico o dalle immagini radiologiche cerebrali. La malattia cerebrovascolare è definita dalla presenza di segni neurologici focali consistenti con uno stroke, con o senza una storia positiva per stroke;
- 3) stretta correlazione tra i due disturbi. Deve esistere un'associazione temporale tra i due disturbi (insorgenza della demenza entro 3 mesi dallo stroke).

Caratteristiche cliniche che supportano la diagnosi di VaD

- 1) Improvviso deterioramento dello stato cognitivo, entro 3 mesi da uno stroke e un peggioramento progressivo con decorso fluttuante o a gradini. Al contrario, la malattia di Binswanger ha un esordio graduale, declino lento o a gradini.
- 2) Storia di disturbo della marcia e di cadute frequenti.
- 3) Incontinenza urinaria precoce rispetto all'esordio della malattia.
- 4) All'esame neurologico le caratteristiche tipiche includono: a) presenza di reperti focali come emiparesi o deficit del facciale inferiore; b) perdita sensoriale (soprattutto alterazioni del campo visivo); c) sindrome pseudo bulbare con incontinenza emotiva; d) segni extrapiramidali (rigidità e acinesia), soprattutto nella malattia di Binswanger e, molto più raramente, anche nella VaD; e) depressione, variazione del tono dell'umore e altri sintomi psichiatrici.

Criteri per la diagnosi di VaD

La VaD è un disordine complesso caratterizzato da decadimento cognitivo causato da uno stroke ischemico o emorragico o da lesioni cerebrali ischemico-ipoossiche. I criteri clinici per la diagnosi di VaD probabile, possibile e definita sono stati così delineati.

I - I criteri per la diagnosi di demenza vascolare probabile includono tutti i seguenti punti:

- 1) La *demenza* è definita come un declino cognitivo rispetto a un livello cognitivo precedente più alto, che si manifesta attraverso un disturbo di memoria associato a deficit in altre due o più aree cognitive (orientamento, attenzione, linguaggio, funzioni visuospatiali, funzioni esecutive, controllo motorio e prassia), evidenziati dall'esame clinico e documentati attraverso una valutazione neuropsicologica testistica; i deficit devono essere tanto gravi da interferire con le funzioni della vita quotidiana indipendentemente dalle condizioni fisiche determinate dallo stroke solamente.
- 2) *Criteri di esclusione*: casi con disturbo di coscienza, delirium, psicosi, afasia grave o con compromissione sensomotoria maggiore che precludano la valutazione testistica. Escludono la diagnosi anche disordini sistemici o altre malattie cerebrali che di per sé potrebbero giustificare la presenza di una demenza.
- 3) La *malattia cerebrovascolare* è definita dalla presenza, all'esame neurologico, di segni focali come emiparesi, debolezza del facciale inferiore, segno di Babinski, deficit sensoriali, emianopsia, disartria consistenti con lo stroke (con o senza storia di stroke) e rilevante malattia vascolare cerebrale dimostrata alla TC o alla RM, che può essere rappresentata da: *infarti multipli dei grossi vasi* o *singolo infarto in posizione strategica* (giro angolare, talamo, proencefalo basale o territorio della PCA o della ACA) o *lacune multiple nei gangli della base e nella sostanza bianca* o *lesioni estese della sostanza bianca periventricolare*.
- 4) Deve essere presente anche una *relazione tra i due disordini sopra menzionati*, manifesta o dedotta dalla presenza di uno o più dei seguenti elementi: a) esordio della demenza entro 3 mesi dalla diagnosi di stroke; b) improvviso deterioramento delle funzioni cognitive o progressione fluttuante, a gradini, del disturbo cognitivo.

II - Le caratteristiche cliniche in accordo con la diagnosi di demenza vascolare probabile includono quanto segue:

- a) presenza precoce di disturbi della marcia (marcia a piccoli passi o andatura magnetica, aprassico-atassica o parkinsoniana);
- b) storia di instabilità e di frequenti cadute inspiegabili;
- c) sintomi urinari precoci non dovuti a malattie urologiche;
- d) paralisi pseudobulbare;
- e) cambiamenti della personalità e dell'umore, abulia, depressione, incontinenza emotiva o altri deficit sottocorticali, come rallentamento psicomotorio e alterata funzione esecutiva.

III - Le caratteristiche che rendono la diagnosi di demenza vascolare incerta o improbabile includono:

- a) esordio precoce dei disturbi di memoria e progressivo peggioramento della memoria e delle altre funzioni come il linguaggio (afasia transcorticale sensoriale), le abilità motorie (aprassia) e la percezione (agnosia) in assenza di lesioni focali corrispondenti alla TC o alla RM cerebrale;
- b) assenza di segni neurologici focali diversi dai disturbi cognitivi;
- c) assenza di lesioni cerebrovascolari alla TC o alla RM cerebrale.

IV - La diagnosi clinica di demenza vascolare possibile può essere posta in presenza di demenza con segni neurologici focali in pazienti in cui mancano esami di neuroimaging cerebrale che confermino una malattia cerebrovascolare definita; o in assenza di una chiara relazione temporale tra la demenza e lo stroke; o in pazienti con esordio subdolo dei sintomi, con decorso variabile del disturbo cognitivo (plateau o miglioramento) ed evidenza di una rilevante malattia cerebrovascolare.

V - I criteri per la diagnosi di demenza vascolare definita sono:

- a) i criteri clinici per la diagnosi di demenza vascolare probabile;
 - b) evidenza istopatologica di malattia cerebrovascolare ottenuta tramite autopsia o biopsia;
 - c) assenza di placche senili e aggregati neurofibrillari più numerosi di quanto ci si possa attendere considerando l'età del soggetto in esame;
 - d) assenza di altre condizioni in grado di provocare demenza.
- VI - La classificazione della VaD** a scopo di ricerca può essere fatta sulla base delle caratteristiche cliniche, radiologiche e neuropatologiche, per sottocategorie, o per condizioni particolari come la VaD corticale, la VaD sottocorticale, la malattia di Binswanger e la demenza talamica.

In merito, poi, alla cosiddetta demenza "mista", che alcuni autori ritengono essere la forma più frequente di demenza, i criteri ICD-10 usano il termine di demenza mista per indicare pazienti che rispondono sia ai criteri per la demenza vascolare che a quelli per la malattia di Alzheimer. Al contrario, per i criteri ADDTC la diagnosi di demenza mista viene posta quando, oltre alla malattia vascolare, coesistono una o più patologie potenzialmente in grado di provocare demenza. In tal modo il termine risulta aspecifico, includendo, oltre alla malattia di Alzheimer, tutte le altre possibili cause di demenza. I criteri DSM-IV intendono per demenza mista tutti i casi che rispondono ai criteri per la demenza di malattia di Alzheimer con però un'evidenza clinica o neuroradiologica di cerebrovasculopatia, mentre secondo i criteri NINDS-AIREN il termine dovrebbe essere sostituito da quello di malattia di Alzheimer con cerebrovasculopatia. Ciò sulla base di un assunto secondo il quale se sono soddisfatti i criteri NINDS-ADRDA per la malattia di Alzheimer e sono evidenti le tipiche caratteristiche neuroradiologiche della malattia di Alzheimer, la diagnosi di malattia di Alzheimer deve prevalere sulla diagnosi di demenza vascolare.

I criteri vengono identificati attraverso un percorso in due fasi successive: una fase di screening e una fase di conferma (Milne et al., 2008). La fase di screening è gestita dal medico curante ed è finalizzata ad individuare il sospetto diagnostico fornito dai familiari accertati di disturbi mnesici o comportamentali, per valutare l'eventuale presenza di demenze reversibili ed effettuare una prima indagine differenziale. E' effettuata mediante anamnesi completa del paziente, esame fisico e neurologico per individuare segni focali, valutazione cognitiva (Mini Mental State Examination -MMSE, Milan Overall Dementia Assessment – MODA, Severe Impairment Battery-SIB), non cognitiva, comportamentale/affettivo (NeuroPsychiatric Inventory-NPI, Cornell Scale, Geriatric Depression Scale-GDS) e funzionale (Bartherl Index, Bedford Alzheimer Assessment Nursing Scale – BAANS, Basic Activity of Daily Living – BADL, Instrumental Activity of Daily Living – IADL, Advanced Activity of Daily Living – AADL) e valutazione dello stadio della demenza tramite il Clinical Dementia Rating (CDR). Non esiste comunque una batteria di test standardizzata. Vengono inoltre effettuati test di laboratorio (emocromo completo, VES, elettroliti sierici, azotemia, glicemia, creatinemia, uricemia, bilirubinemia, SGOT, SGPT, gGT, elettroforesi proteica), valutazione della funzionalità tiroidea, dosaggio vitamina B12 e folati, sierologia per la sifilide, analisi delle urine), esami strumentali (ecg, Rx Torace) e neuroimaging (TAC, RMN).

Alla fase di screening segue una fase diagnostica per verificare l'effettiva presenza di una e più sicura eziologia. Ciò attraverso neuroimaging funzionale (PET, SPECT), puntura lombare ed elettroencefalogramma ed una batteria di test neuropsicologici sulle funzioni cognitive (NPS).

La diagnosi differenziale tra demenza vascolare e demenza Alzheimer è spesso molto difficile, tuttavia uno strumento che permette con buona approssimazione di discriminare tra le due patologie è la scala ischemica di Hachinski (HIS).

Molto complessa è anche la diagnosi differenziale tra demenza vascolare e depressione, tra le quali vi è una ampia sovrapposizione causa di frequenti problemi gestione clinica. L'esatto significato del disturbo depressivo che compare nelle fasi iniziali della demenza è tuttora incerto; variabili biologiche sono probabilmente coinvolte, anche se aspetti di personalità, insight di malattia, livello funzionale, variabili sociali ed ambientali sono associate variamente alla comparsa di sintomi depressivi.

1.4.2.1 Principali Test Utilizzati

Il **Mini Mental State Examination** è una prova che, in pochi minuti, può dare delle interessanti informazioni diagnostiche sullo stato cognitivo del paziente. Il MMSE è uno strumento ideato per valutare, in ambito clinico, le capacità cognitive del soggetto; la sua somministrazione richiede 10-15 minuti. È costituito da 11 item tramite i quali vengono valutate in modo semplice le varie funzioni cognitive, ed in particolare l'orientamento temporale e spaziale, la memoria immediata (memoria di fissazione o registrazione), l'attenzione e calcolo, la memoria di richiamo e il linguaggio (denominazione, ripetizione, comprensione orale, comprensione scritta e generazione di frase scritta). Parte delle informazioni possono essere raccolte sotto forma di colloquio. Il valore massimo del test è 30, sono considerati normali punteggi uguali o superiori a 24, valori tra 23-18 indicano una demenza in fase iniziale, tra 17-10 demenza moderata e minori di 10 una demenza grave, sebbene all'esordio un paziente possa anche avere un valore di MMSE pari a 24 e poi peggiore con il progredire della malattia. Questo test ha nel suo stesso pregio, la brevità, anche il suo limite; infatti non permette una completa valutazione delle funzioni cognitive e non è pertanto sufficientemente sensibile alle fasi iniziali della demenza. In particolare, il MMSE è influenzato dal livello di educazione e dalla scolarità del soggetto e per questo motivo si raccomanda l'uso di punteggi corretti. Questo test presenta alcuni svantaggi per lo screening delle demenze vascolari, infatti, è molto più sensibile per i deficit corticali che per quelli sottocorticali per i quali il **MODA** ha una maggiore sensibilità. Rispetto al MMSE è più accurato in quanto ispeziona maggiori domini cognitivi. Il MODA è composto da tre sezioni. La prima sezione riguarda l'orientamento e distingue tra orientamento temporale, spaziale, personale e familiare. La seconda sezione consiste in una scala di autonomia quotidiana, le domande di questa scala vengono rivolte ad un congiunto o ad un convivente. La terza ed ultima sezione è quella più propriamente testistica. Questa sezione è composta da nove test che indagano abilità cognitive quali l'attenzione, l'intelligenza verbale, la memoria, la fluency verbale, la percezione e l'identificazione degli stimoli.

L'**Indice di Barthel** rappresenta uno degli strumenti di valutazione della funzione fisica più noti, soprattutto in ambito riabilitativo. Fornisce un punteggio indicativo delle capacità del soggetto di alimentarsi, vestirsi, gestire l'igiene personale, lavarsi, usare i servizi igienici, spostarsi dalla sedia al letto e viceversa, deambulare in piano, salire e scendere le scale, controllare la defecazione e la minzione. Il punteggio assegnato per ogni funzione può essere 15, 10, 5 o 0. Per esempio, vengono assegnati 10 punti se il soggetto si alimenta

autonomamente e 5 punti se richiede aiuto (per esempio tagliare il cibo. Il punteggio massimo è assegnato solo se il paziente esegue il compito in modo completamente indipendente, senza la presenza di personale d'assistenza. Il punteggio massimo totale è 100 ed indica l'indipendenza in tutte le attività di base della vita quotidiana.

La **BANSS** fornisce informazioni sul grado di compromissione cognitiva (linguaggio e contatto oculare) funzionale (abbigliamento, alimentazione, deambulazione) e sulla presenza di sintomi patologici (alterazioni del ciclo sonno-veglia, rigidità muscolare/contratture). La BANSS consente di ottenere informazioni sulle condizioni cognitivo/funzionali del paziente finché quest'ultimo raggiunge lo stato vegetativo. La compilazione della BANSS si esegue utilizzando le informazioni del personale di assistenza e l'esame obiettivo del paziente. Il punteggio ottenuto oscilla tra 7 e 28 ed è direttamente proporzionale al livello di gravità della malattia.

La scala delle **IADL** valuta la capacità di compiere attività che vengono normalmente svolte anche da soggetti anziani e che sono considerate necessarie per il mantenimento della propria indipendenza. La scala è usualmente utilizzata nella forma dicotomica, che prevede per ogni item due sole possibili risposte: "indipendente" (1) e "dipendente" (0). E' necessario tuttavia considerare i singoli item, in quanto sono questi che contribuiscono a creare il profilo della disabilità dell'anziano. Le IADL sono fortemente influenzate dalle funzioni cognitive, anche se dipendono in buona parte dalla situazione ambientale, dalle abitudini del soggetto (ruolo sociale o familiare) e dalle funzioni fisiche. L'autonomia in queste abilità definisce la possibilità di un individuo di vivere in modo autonomo al proprio domicilio. Le **BADL** sono maggiormente influenzate dalle funzioni fisiche che da quelle cognitive; nella demenza, infatti, si assiste generalmente ad una rapida perdita delle IADL, mentre per la maggior parte delle BADL il paziente può rimanere a lungo totalmente autosufficiente. Con l'aggravamento del deficit cognitivo anche l'autonomia nelle attività di base viene progressivamente a perdersi, fino alla completa disabilità nelle fasi più avanzate. Gli strumenti che misurano le BADL e le IADL sono però poco sensibili ai disturbi funzionali di soggetti nelle fasi iniziali della demenza, particolarmente quando si tratta di individui con estesi interessi sociali e relazionali. Per ovviare a questo aspetto è stato introdotto il concetto di attività avanzate della vita quotidiana (Advanced Activity of Daily Living - **AADL**), per rappresentare quelle più complesse ed impegnative, quali gli hobby e le attività ricreative, i viaggi, la partecipazione ad attività sociali o culturali. Queste abilità non sono essenziali per mantenere l'indipendenza e sono fortemente influenzate, oltre che dalle funzioni cognitive, dalla salute fisica, dal tono dell'umore, da variabili culturali e motivazionali; inoltre esiste in

questo ambito una ampia variabilità individuale. Nonostante questi limiti, l'attenta valutazione delle AADL permette di svelare quelle modificazioni del comportamento che, benché di per sé non indicative di decadimento cognitivo, devono far sospettare la presenza di una demenza nelle fasi iniziali. Un altro problema degli strumenti abitualmente in uso è il cosiddetto "effetto pavimento" nella valutazione delle BADL, quando al livello più basso delle usuali scale funzionali vengono compresi individui con gradi anche molto diversi di disabilità.

La **Geriatric Depression Scale** è una tra le più diffuse scale per la valutazione di sintomi depressivi. E' uno strumento composto da 30 items, che esclude la rilevazione dei sintmi somatici e di sintomi psicotici. Le risposte sono di tipo binario (si/no) e questo rende lo strumento di più facile utilizzo nei pazienti anziani con deficit cognitivo. Il punteggio varia da 0 (non depresso) a 30 (massima gravità della depressione), con un cut-off individuato a 11 per la presenza di sintomi depressivi clinicamente rilevanti. La gravità della depressione viene quindi così rappresentata: da 0 a 10 assente, da 11 a 16 depressione lieve-moderata, 17 o superiore depressione grave.

Cornell Scale for Depression in Dementia (CDS) è una scala appositamente disegnata per la valutazione dei sintomi depressivi nei pazienti dementi. La Cornell Scale utilizza una serie standardizzata di item che sono rilevati attraverso un'intervista ad una persona che conosce il paziente (familiare o operatore) ed il colloquio semistrutturato con il paziente. Si tratta quindi di uno strumento osservazionale, che non richiede quindi la risposta diretta del paziente a domande formulate in modo standardizzato. La scala si compone di 19 item, con risposte che hanno un punteggio graduato da 0 (sintomo assente) a 2 (sintomo severo). E' una delle poche scale validate in popolazioni di soggetti dementi, anche di entità moderato-severa (*Ballard et al, JAGS, 1997;45:123-124*).

Clinical Dementia Rating Scale necessita di informazioni raccolte da un familiare o operatore che conosce il soggetto e di una valutazione delle funzioni cognitive del paziente con particolare riferimento ai seguenti aspetti: 1) memoria; 2) orientamento temporale e spaziale; 3) giudizio ed astrazione; 4) attività sociali e lavorative; 5) vita domestica, interessi ed hobby; 6) cura della propria persona. In base al grado di compromissione viene assegnato un punteggio variabile tra 0 - 0.5 - 1 - 2 - e 3; 0= normale; 0.5= dubbia compromissione; 1 compromissione lieve; 2= compromissione moderata; 3= compromissione severa. Ogni aspetto va valutato in modo indipendente rispetto agli altri. La memoria è considerata categoria primaria; le altre sono secondarie. Se almeno tre categorie secondarie ottengono lo stesso punteggio della memoria, allora il CDR è uguale al punteggio ottenuto nella memoria.

Se tre o più categorie secondarie ottengono un valore più alto o più basso della memoria, allora il punteggio della CDR corrisponde a quello ottenuto nella maggior parte delle categorie secondarie. Qualora due categorie ottengano un valore superiore e due un valore inferiore rispetto a quello ottenuto dalla memoria, il valore della CDR corrisponde a quello della memoria. La scala è stata successivamente estesa per classificare in modo più preciso gli stadi più avanzati della demenza (Hayman et al, 1987). I pazienti possono essere perciò classificati in stadio 4 (demenza molto grave) quando presentano severo deficit del linguaggio o della comprensione, problemi nel riconoscere i familiari, incapacità a deambulare in modo autonomo, problemi ad alimentarsi da soli, nel controllare la funzione intestinale o vescicale. Sono classificati in stadio 5 (demenza terminale) quando richiedono assistenza totale perché completamente incapaci di comunicare, in stato vegetativo, allettati, incontinenti.

L'**NPS** in aggiunta al test del MMSE eseguito in fase di screening, include:

1. Test delle parole di Rey a richiamo immediato e differito (memoria verbale a breve e lungo termine).
2. Test di memoria visiva immediata (memoria visiva a breve termine).
3. Rievocazione della figura complessa di Rey-Osterrieth (memoria visuo-spaziale a lungo termine); Double Barrage test (abilità di attenzione visiva); Stroop test ridotto (abilità attentive superiori); Copia di disegni a mano libera e copia con elementi di programmazione (prassia costruttiva semplice); Copia della figura complessa di Rey-Osterrieth (prassia costruttiva complessa); Matrici colorate progressive di Raven 47 (abilità di ragionamento logico-induttivo); Fluidità verbale fonologica e semantica (fluenza verbale); Test di riconoscimento di volti di Bentos (prosopognosia).

Nell'**HIS** per la diagnosi differenziale tra demenza vascolare e Alzheimer vengono assegnati 1 o 2 punti per ogni elemento presente all'anamnesi o all'esame obiettivo del paziente. Un punteggio totale >7 è indicativo di Demenza vascolare, mentre un punteggio totale <4 è indicativo della presenza di demenza.

ITEM	SCORE
Esordio brusco	2
Deterioramento a gradini	1
Decorso fluttuante	2
Confusione notturna	1
Relativa conservazione della personalità	1
Depressione	1

Disturbi somatici	1
Incontinenza emozionale	1
Ipertensione	1
Stroke	2
Aterosclerosi	1
Sintomi neurologici focali	2
Segni neurologici focali	2

1.4.2.2 Neuroimaging

La TAC misura lo spessore di una determinata parte del cervello che si assottiglia negli ammalati di Alzheimer ma un tale quadro è simile in molti altri casi di demenza, al contrario presenta una grande affidabilità nel confermare o escludere la presenza di alterazioni strutturali cerebrali potenzialmente reversibili quali causa di demenza (quali ematoma subdurale, idrocefalo normoteso), o lesioni cerebrovascolari caratteristiche dell'eziologia vascolare della demenza. Come la TC, la RMN fornisce immagini della struttura cerebrale, ma con una maggiore sensibilità al contrasto. A differenza della TC, permette la distinzione della sostanza bianca da quella grigia, l'evidenziazione di strutture piccole, quali l'amigdala e l'ippocampo e la descrizione delle lesioni con una maggiore risoluzione spaziale. È così possibile individuare piccoli infarti sottocorticali e alterazioni diffuse della sostanza bianca, facilitando la diagnosi differenziale fra AD e VD. Non esistono però immagini TC o RM patognomoniche per la demenza vascolare, ovvero non esistono immagini TC o RM talmente caratteristiche della demenza vascolare da permettere da sole di formulare tale diagnosi. Nei casi di forme molto iniziali, casi dubbi o per una migliore diagnosi differenziale con la malattia di Alzheimer, si fa ricorso a tecniche con migliore accuratezza diagnostica come la tomografia ad emissione di positroni (PET), e la tomografia computerizzata a emissione di fotoni singoli (SPECT). La PET fornisce informazioni circa la funzione cerebrale. Vengono utilizzati vari traccianti ad emissione di positroni per misurare differenti funzioni cerebrali (per il metabolismo regionale del glucosio, che riflette l'attività neuronale in specifiche aree cerebrali; per il flusso regionale cerebrale e per il metabolismo dell'ossigeno); recentemente sono stati inoltre sviluppate sostanze che permettono di valutare "in vivo" il pattern di distribuzione dei recettori per vari neurotrasmettitori. Questa tecnica ha dimostrato una affidabilità del 90% nella differenziazione dei soggetti dementi dai non dementi e può essere utili nella diagnosi differenziale fra AD e VD in quanto in quest'ultima

si rilevano anormalità focali ed asimmetriche. La SPECT, più economica della PET misura il flusso ematico nel cervello (legato alle variazioni del metabolismo del glucosio), che nei malati di Alzheimer è minore rispetto ai soggetti sani quindi può essere utilizzata per differenziare le varie forme di demenza fra di loro ed i soggetti non dementi. Recentemente si sono resi disponibili un certo numero di ligandi di neurotrasmettitori radiomarcanti per lo studio dei recettori. L'uso estensivo della PET e della SPECT trova un limite dalla scarsa disponibilità della metodica e dal loro costo elevato e non migliorando la diagnosi quando il paziente è stato valutato correttamente dal punto di vista clinico ed ha effettuato una TC o RM ed attualmente rivestono un significato essenzialmente di ricerca (Panza et al, 2002).

1.4.2.3 Diagnosi precoce e marker

Diagnosticare quanto più precocemente possibile la demenza presenta indubbi vantaggi sulla diagnosi in fase avanzata, in quanto permette un tempestivo intervento sulle cause delle demenze reversibili, l'istituzione di terapie che possono ritardare la progressione della malattia, l'inizio di terapie che possono potenziare la performance cognitiva del paziente sfruttando la sua non completa compromissione dei circuiti neuronali e l'attuazione di misure che riducono gli effetti della comorbidità associata alla demenza. L'utilizzo di alcuni strumenti di screening può evidenziare deficit cognitivi o funzionali in soggetti asintomatici anticipando in misura significativa i tempi della diagnosi. Si tratta però di strumenti che presentano una insoddisfacente specificità che, se applicati in popolazioni di soggetti asintomatici, avrebbero come risultato quello di individuare un elevato numero di falsi positivi.

Allo scopo di poter effettuare una diagnosi precoce, sono stati individuati molti markers biologici nel fluido cerebrospinale (CSF) in quanto esso, avvolgendo la struttura cerebrale ne riflette la composizione. Ad esempio è stato evidenziato che nei malati di Alzheimer il liquido cerebrospinale è caratterizzato da concentrazioni più elevate di beta-miloide e proteina tau fosforilata rispetto ad anziani che non presentano la patologia, anche nello stadio iniziale. Ma la puntura lombare effettuata per il prelievo del liquido cerebrospinale è altamente invasiva e poco ripetibile, soprattutto in soggetti anziani. Viceversa campioni di plasma e siero sono più facilmente ottenibili e sono anch'essi ricchi di marker diagnostici, tanto più che 500ml al giorno di CSF vengono assorbiti nel sangue circolante. Nonostante siano stati proposti molti markers diagnostici a livello plasmatico e sierico (alti livelli di betamiloide, proteina tau fosforilata, proteina APOE, alte

concentrazioni di prodotti di ossidazione come isoprostani, di recettori di infiammazione come proteina C reattiva, interleucina IL-6, TNFalfa, interferone beta e gamma, alfa1-antichimotripsina, di colesterolo e suo metabolita 24S-idrossicolestrolo) ad oggi nessuno ha fornito risultati soddisfacenti, sia perché le differenze rispetto ai controlli sono in molti casi poco significative, sia perché gli studi effettuati a tal riguardo mostrano andamenti talvolta opposti e contrastanti (Schneider et al., 2009). Molto controversa appare la relazione tra colesterolo e malattie dementigene. Recenti studi hanno evidenziato come l'aterosclerosi, di cui l'ipercolesterolemia è il maggiore fattore di rischio, era positivamente associata con tutte le forme di demenza, sia quelle vascolari sia quella di Alzheimer e come elevati livelli medi di colesterolo plasmatici fossero collegati allo sviluppo della malattia (Hofman et al, 1997; Notkola et al.,1998; Kivipelto et al. 2001), al contrario in altri studi non è stata trovata alcuna significativa associazione tra il rischio di malattia di Alzheimer ed i livelli plasmatici di colesterolo totale presenti (Zalady et al., 2003.; Zuliani et al., 2001).

1.4.2.4 Colesterolo e Alzheimer

Da studi effettuati in vitro, per lo più su cellule embrionali umane o ippocampali di ratto è stato possibile capire che la diminuzione del contenuto di colesterolo nelle culture cellulari neuronali abbassa la produzione di A β 42 attraverso un diminuzione della attività enzimatica β e γ -secretasica (Simons et al., 1998; Frears. et al.,1999; Kojro et al., 2001; Simons et al., 1996). La proteolisi di APP non amiloidogenetica da parte dell' α -secretasi, invece, risulta essere stimolata in presenza di riduzione del colesterolo nel mezzo di coltura. Ciò ha indotto i ricercatori a sviluppare una teoria (Simons et al., 2001; Launer et al., 2001) secondo cui domini di membrana poveri di colesterolo favorirebbero l'attività dell' α -secretasi i cui prodotti non sono patologici. Domini di membrana ricchi in colesterolo (lipid rafts) favorirebbero, di contro, l'attività degli enzimi β e γ secretasi che, come è noto, producono A β 42. Tutto questo ha anche una spiegazione sul piano della fisica della fluidodinamica. L'arricchimento dei domini di membrana con il colesterolo, infatti, fa mutare completamente le caratteristiche chimico-fisiche della membrana stessa. Le membrane in corrispondenza dei lipid rafts infatti, sono molto più rigide e hanno proprietà di permeabilità del tutto peculiari verso gli ioni come verso i gas. Queste particolari caratteristiche che le membrane assumono quando si arricchiscono di colesterolo potrebbero, attraverso attrazione di complessi proteici accessori o anche semplicemente mediante un mutamento conformazionale dei metameri enzimatici, favorire alcune vie metaboliche a

scapito di altre o modificare la cinetica delle stesse. Nell'ambito di questo modello trova posto anche il ruolo delle apolipoproteine E che si occupano dell'escrezione cerebrale del colesterolo. Le isoforme E4 delle ApoE hanno dimostrato di essere in grado di mantenere un minore efflusso di colesterolo dai neuroni se paragonate alle isoforme E3 o E2. Questo significa che in un soggetto omozigote per ApoE4 mediamente si ha una più elevata concentrazione intracitoplasmatica di colesterolo totale e che, quindi, è facilitata la creazione di domini di membrana ricchi in colesterolo che a loro volta favoriscono le proteolisi amilodigenetiche di APP da parte della β e γ secretasi.

Un'altra ipotesi che mette in relazione colesterolo ed alti livelli di beta amiloide non prevede che il colesterolo ne rappresenti la causa bensì una conseguenza causata dalla degradazione della membrana dovuta alla degenerazione neuronale determinata dalle placche amiloidi, con conseguente rilascio di colesterolo.

1.4.2.5 Colesterolo e sistema nervoso centrale

Il colesterolo rappresenta il 2-3 % del peso del cervello e il 25% del totale colesterolo corporeo si trova nel SNC. Di questo, il 99,5% è presente in forma esterificata essenzialmente in due distretti ben localizzati: le guaine mieliniche e le membrane delle cellule neuronali e astrocitarie. E' stato a tal proposito calcolato che circa il 70% del colesterolo cerebrale è associato alle guaine mieliniche. Poiché il colesterolo introdotto con la dieta non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica il colesterolo circolante nel SNC è di sintesi ex novo (Leoni, 2009). La produzione di colesterolo a livello del sistema nervoso centrale avviene negli astrociti. Il colesterolo prodotto esce dalle cellule mediante i trasportatori ABCA1 e, grazie alle ApoE del circolo cerebrale, raggiunge la sede di utilizzazione, i neuroni. Nelle cellule neuronali il colesterolo viene utilizzato per le funzioni biologiche quali trasduzione del segnale, scambio ionico, ingresso di sostanze e gas, endo ed eso-citosi e altro ancora. Per mantenere l'omeostasi del colesterolo cerebrale il colesterolo neuronale in eccesso viene trasformato a livello della membrana plasmatica da una sottoclasse di enzimi appartenenti alla famiglia dei citocromi P450: il CYP46 o 24-idrossilasi. Questo enzima trasforma il colesterolo in 24S-idrossicolesterolo, un ossisterolo in grado di attraversare liberamente la barriera emato-encefalica e di essere escreto mediante gli acidi biliari, dopo essere stato captato dal fegato. Il 24S-idrossicolesterolo, inoltre, a livello astrocitario è in grado di inibire la produzione endogena di colesterolo e di attivare l'espressione dei trasportatori ABCA1. Quest'ultima attivazione si esplica mediante i Liver

X Receptor, stimolati direttamente dal 24S-idrossicolesterolo, che mediante il legame diretto al patrimonio genetico in sede nucleare sono in grado di attivare la trascrizione dei geni di ABCA1 (Plotz et al., 1968). In Figura 15 è riportato il metabolismo del colesterolo descritto.

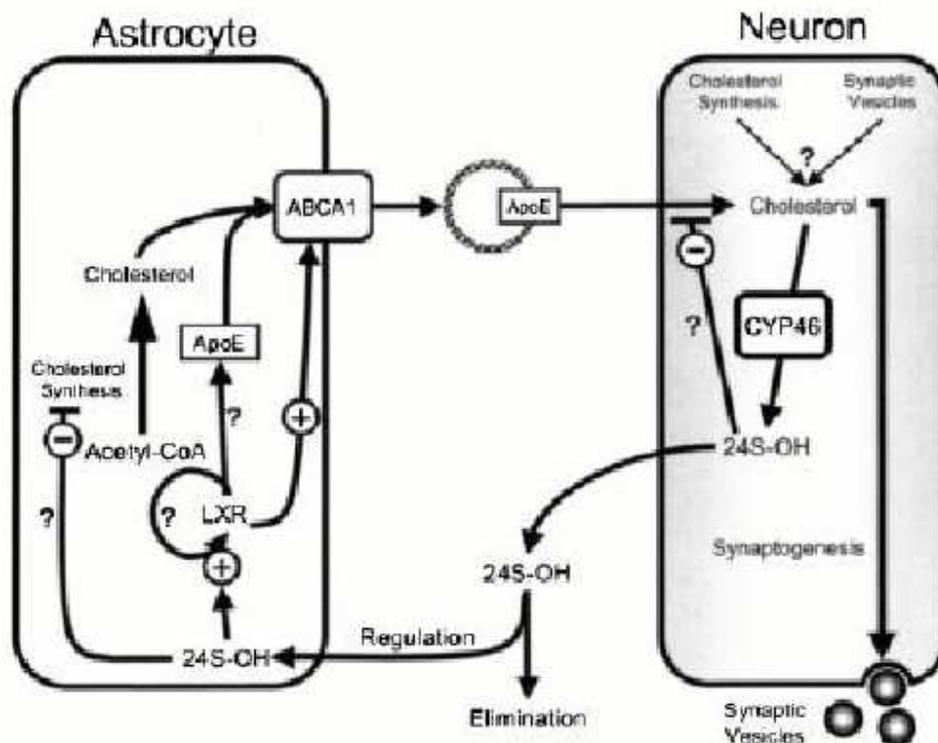


Figura 15. Metabolismo del colesterolo a livello neuronale.

1.4.2.6 24S-Idrossicolesterolo

Poiché il 24S-idrossicolesterolo è esclusivamente di origine cerebrale, sia il suo livello plasmatico o sierico (99%) che quello del liquido cerebrospinale (1%), danno indicazioni su una eventuale alterazione del metabolismo del colesterolo a livello del SNC, implicato delle patologie dementigene, fungendo da possibile marker precoce (Leoni, 2009). Ma mentre è stata identificata una correlazione tra aumento del livello di 24S-idrossicolesterolo nel liquido cerebrospinale e presenza di Alzheimer e demenza vascolare, in confronto a controlli non patologici, per quanto riguarda il dosaggio plasmatico vi sono ad oggi risultati contrastanti supportati da altrettanto contrastanti teorie che non portano ancora ad una utilizzazione del 24S-idrossicolesterolo come marker precoce per queste patologie (Irizarry, 2004). Una lieve diminuzione (Bjorkhem et al., 2000), non statisticamente significativa, dei valori medi di 24S-idrossicolesterolo circolante, nei pazienti affetti da AD e VD rispetto ai controlli, è stata riscontrata in uno studio effettuato in Svezia. Tali risultati

sono stati giustificati considerando che la perdita neuronale tipica di queste malattie è associata ad una diminuzione dell'enzima 24-idrossilasi con conseguente riduzione della formazione di 24S-idrossicolesterolo. Lo stesso andamento è stato riportato in uno studio effettuato da ricercatori tedeschi (Kolsh et al., 2004), in cui il valori di 24S-idrossicolesterolo sono stati corretti per i rispettivi valori di colesterolo, essendo questi strettamente correlati. Il rapporto 24S-idrossicolesterolo/colesterolo ottenuto è risultato di poco inferiore nei pazienti con AD rispetto ai controlli, mentre una diminuzione maggiormente significativa è stata riscontrata nei pazienti con VD ed MCI. Una scarsa differenza è stata invece riscontrata tra le medie dei tre gruppi VD, MCI e AD. Al contrario, da uno studio effettuato in Germania (Lutjohann et al., 2000), si evidenzia un aumento del valore medio di 24S-idrossicolesterolo nei pazienti con VD e AD rispetto ai controlli, spiegato con il fatto che la degenerazione neuronale comporta la disgregazione della membrana e rilascio del colesterolo che viene convertito nel suo metabolita. Una differenza non significativa è stata però evidenziata nella discriminazione tra i gruppi AD e VD. In questo studio i singoli valori di 24S-idrossicolesterolo sono stati messi in relazione con i valori del MMSE riscontrati nel paziente, e quindi con lo stadio della malattia ed è stata evidenziata una correlazione positiva tra AD e MMSE ma non con VD. Una correlazione positiva indica che al progredire della malattia il livello di 24S-idrossicolesterolo diminuisce e questo perché man mano che la malattia progredisce, il colesterolo disponibile al rilascio da parte delle membrane diminuisce. E' stata anche evidenziata (Papassotiropoulos et al., 2000) una correlazione tra i livelli di 24S-idrossicolesterolo e la severità della malattia con alti livelli nella fase iniziale e bassi livelli nella fase grave della malattia. Tale diminuzione viene spiegata oltre che con i bassi livelli di colesterolo disponibili con il progredire della malattia anche con la diminuzione dell'enzima 24-idrossilasi, a causa delle sempre maggiore perdita neuronale, o con un processo di feedback che blocca la degradazione del colesterolo per mantenerne l'omeostasi.

1.5 Cromatografia liquida

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) è uno strumento analitico derivato dalla cromatografia classica e si basa sugli stessi principi. Nella cromatografia classica il componente principale è la colonna, che contiene la fase stazionaria all'interno della quale scorre la fase mobile rappresentata dall'eluente. Il passaggio dell'eluente avviene

tramite la spinta esercitata dalla colonna di liquido costituente la fase mobile e quindi il processo, se la fase stazionaria non è abbastanza porosa, può essere anche molto lento. La separazione dei componenti avviene tramite interazioni che si creano fra i costituenti della miscela e le due fasi. Nell'HPLC la forza che permette all'eluente di scorrere nella colonna, è rappresentata dalla pressione che è applicata da una pompa in testa alla colonna e forza la fase mobile a scorrere all'interno della fase stazionaria. Questo permette non solo di rendere il processo più rapido ma permette anche di ottenere un maggior numero di piatti teorici, il che vuol dire una migliore risoluzione. Il piatto teorico di una colonna cromatografia corrisponde a quel tratto di colonna nel quale una specie chimica si trova in equilibrio fra le due fasi (stazionaria e mobile) prima che l'eluente la trascini ad uno stadio successivo. L'esperienza dimostra che l'efficienza di una colonna è direttamente collegata al numero di piatti teorici. Con l'aumentare di questi ultimi i diversi componenti di una miscela escono dalla colonna in bande più compatte. La velocità della fase mobile espressa in termini di flusso (ml/min) è un parametro che incide sul numero dei piatti teorici e quindi sull'efficienza della colonna. I primi sviluppi positivi nella cromatografia liquida furono fatti dopo che si ipotizzò che si poteva aumentare l'efficienza di una colonna impaccandola con particelle di diametro più piccolo. Solo alla fine degli anni '60 è stata sviluppata una tecnologia adatta alla fabbricazione di particelle di grandezza variabile dai 3 ai 10 μm per impaccare le colonne. Il nome di High Performance Liquid Chromatography (HPLC) serve quindi a distinguere questa nuova tecnologia cromatografica dalla cromatografia classica, ormai usata quasi esclusivamente per scopi preparativi. Con questo tipo di cromatografia liquida, sono richieste pressioni di pompaggio di diverse centinaia di atmosfere, per raggiungere velocità di flusso sufficienti e permettere una buona separazione in colonne impaccate con particelle di diametro variabile dai 3 ai 10 μm . Come conseguenza l'equipaggiamento di una moderna apparecchiatura per HPLC è notevolmente più costoso rispetto a quello della cromatografia classica. La Figura 16 mostra i più importanti componenti di un tipico strumento per HPLC.

Nell'ultimo decennio sono stati sviluppati sistemi ancora più performanti noti come UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), con i quali la cromatografia ha fatto un ulteriore passo in avanti. L'UPLC è il risultato di un'innovazione riguardante la tecnologia delle particelle, delle colonne, degli iniettori e delle pompe, allo scopo di ottenere una maggiore sensibilità, risoluzione e velocità di analisi. Ciò con l'uso di particelle ibride con granulometria inferiore ai 2 μm per la fase stazionaria, combinato alla capacità di erogare fase mobile ad alte pressioni evitando dispersioni.

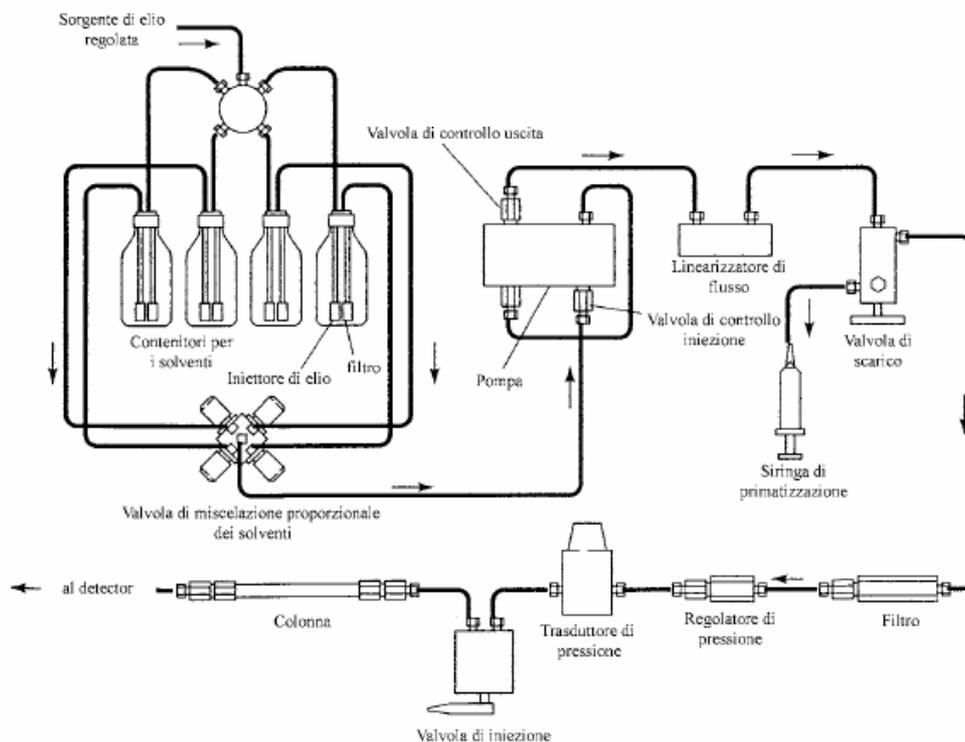


Figura 16. Schema di uno strumento HPLC.

1.6 La spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica utilizzata per identificare prodotti incogniti, per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole e per determinazioni qualitative e quantitative di composti noti. Permette di rilevare le molecole in base al loro rapporto massa/carica (m/z) e quindi almeno dal punto di vista teorico, ogni molecola, poiché possiede una massa, può essere analizzata con uno spettrometro di massa, purché si ottengano i requisiti fondamentali per tale analisi, ossia che la molecola possa essere portata in fase gassosa, che possa essere ionizzata e che venga analizzata sotto vuoto spinto (10^{-5} torr), al fine di non apportare modificazioni alla massa dello ione in questione per idratazione con molecole d'aria. Ogni spettrometro di massa è composto da sei parti fondamentali:

1. sistema di introduzione del campione
2. sorgente (nella quale le molecole vengono ionizzate)
3. analizzatore (in cui gli ioni formati dalla sorgente vengono separati in base al rapporto m/z)
4. rivelatore (in cui il segnale di ogni m/z viene rivelato e amplificato)
5. elaboratore (che permette la ricostruzione dello spettro finale)

6. pompe da vuoto.

In Figura 17 è rappresentato lo schema a blocchi di uno spettrometro di massa.

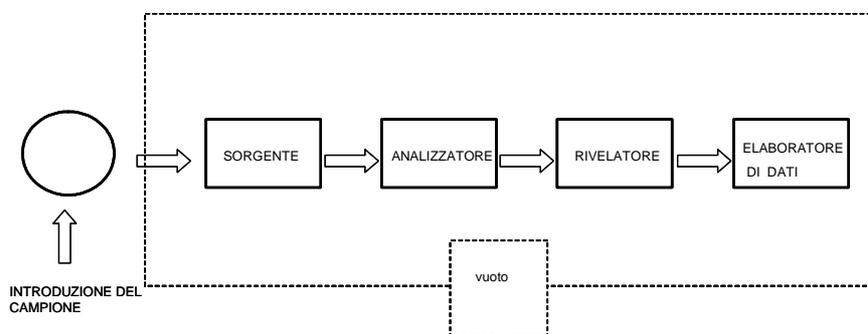


Figura17. Schema a blocchi di uno spettrometro di massa

Sebbene questo schema sia del tutto generale, gli spettrometri di massa differiscono tra loro in potenzialità di analisi e costi, a seconda del tipo di sistema di introduzione del campione, di sorgente e di analizzatore con cui lo strumento è costruito. Ogni parte infatti influenza fortemente le potenzialità dello spettrometro di massa selezionando il tipo di molecole che possono essere analizzate e le modalità con le quali il campione deve essere trattato prima di poter essere introdotto all'interno dello spettrometro. In biochimica clinica è necessario analizzare molecole molto diverse fra loro dal punto di vista delle proprietà chimico-fisiche quindi è necessario conoscere le potenzialità dei vari spettrometri di massa. Parametri decisivi per la scelta dello spettrometro di massa da utilizzare sono le caratteristiche chimico-fisiche del campione da analizzare come ad esempio la termolabilità, la polarità, la capacità di ionizzazione e la volatilità. Per piccole molecole, non termolabili apolari o trasformabili in apolari tramite reazione di derivatizzazione, è possibile utilizzare uno spettrometro di massa accoppiato ad un gas cromatografo, che viene indicato convenzionalmente con la sigla GC/MS. Tali tipi di spettrometro sono i meno costosi ed i più facili da utilizzare e sono caratterizzati dall'aver come sistema di introduzione del campione un gas cromatografo che ha la duplice funzione di portare in fase gassosa le molecole di campione facendo una rampa di temperatura, e di separare nel tempo, mediante un processo cromatografico, i vari analiti presenti nel campione. Le sorgenti utilizzate in tale tipo di strumento sono la sorgente ad impatto elettronico (EI) e la sorgente a ionizzazione chimica (CI), spesso negli strumenti più moderni, intercambiabili tra loro. Nella sorgente ad impatto elettronico la ionizzazione avviene mediante collisione tra molecole dell'analita in fase gassosa ed un fascio di elettroni emessi da un filamento di tungsteno che funge da catodo.

L'energia con cui tali elettroni vengono emessi in tali tipi di strumenti è fissa ed è pari a 70 eV. Poiché tale energia è superiore all'energia media di legame delle molecole, durante la collisione si avrà una frammentazione dell'analita dipendente dall'energia di legame presente all'interno di esso e quindi dalla sua struttura chimica. Con questo sistema di ionizzazione si formano ioni radicali positivi. Con tale sorgente definita *hard* nella maggior parte dei casi non è possibile ottenere lo ione molecolare dell'analita, ma solo una serie di frammenti a vari rapporti massa/carica che costituiranno, poiché l'energia applicata è costante, l'impronta digitale della molecola. E' possibile se si utilizza tale sorgente fare una analisi qualitativa di un composto ricorrendo all'uso di librerie disponibili in commercio e confrontando lo spettro del composto di interesse con lo spettro di riferimento. La sorgente alternativa in questo tipo di strumento è la sorgente a ionizzazione chimica, definita sorgente *soft*, nella quale la ionizzazione avviene per impatto dell'analita con un gas. Tale gas generalmente è metano o ammoniaca preventivamente ionizzato. Poiché la collisione tra l'analita ed il gas coinvolge energie di collisione minori rispetto a quelle che si hanno con la sorgente ad impatto elettronico, tale sorgente permette di vedere nello spettro finale lo ione molecolare del composto o un addotto del composto con molecole di gas. Con l'utilizzo di tale sorgente non è possibile ricorrere all'uso delle librerie, poiché lo spettro è influenzato dal tipo di gas utilizzato per la ionizzazione e dal flusso con cui tale gas viene introdotto all'interno della sorgente. In tal modo si guadagna in sensibilità poiché si ha minore frammentazione dell'analita. Gli analizzatori utilizzati in questo tipo di strumento possono essere analizzatori a settore, a trappola ionica o più frequentemente a quadrupolo. I rivelatori sono costituiti da fotomoltiplicatori in grado di amplificare il segnale degli ioni che impattano sulla loro superficie con un meccanismo a cascata. I limiti di tale spettrometro sono dovuti al fatto che, poiché come sistema di introduzione del campione si utilizza un gas cromatografo, non è possibile analizzare molecole termolabili che si degraderebbero all'interno di esso per le alte temperature raggiunte, né tanto meno molecole polari poco volatili e ad alto peso molecolare. Riguardo a queste ultime, oltre alla difficoltà dovuta alla loro poca volatilità, bisogna tenere presente che i quadrupoli che sono gli analizzatori più usati, lavorano in un *range* di rapporto massa/carica m/z che in quelli più moderni arriva fino a 3.000. Per i limiti di tali spettrometri, hanno preso piede, negli ultimi anni, spettrometri in grado di analizzare molecole fuori del campo di applicabilità della GC/MS. I più utilizzati sono quelli che utilizzano una sorgente Matrix Assisted Laser Ionization (MALDI) e quelli che utilizzano sorgenti a Ionizzazione a Pressione Atmosferica (API) entrambi in grado, utilizzando tecniche di desorbimento, di analizzare molecole termolabili, polari ed in un vasto intervallo di massa.

Con gli strumenti con sorgente API è possibile introdurre il campione in sorgente direttamente in fase liquida. In questo modo è possibile utilizzare come sistema di introduzione del campione un sistema a cromatografia liquida HPLC in linea con lo spettrometro di massa.

La tecnologia API comprende diversi tipi di sorgenti: l'interfaccia electrospray (ES) APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), IonSpray (IS), e APPI (Atmospheric Pressure Photochemical Ionization). La prima sorgente APCI risale al 1974, mentre furono necessari altri 10 anni per presentare l'interfaccia electrospray-LC-MS (Whitehouse et al., 1985) e l'interfaccia ionspray (Bruins et al., 1986). Soltanto alla fine degli anni '80 la tecnologia API cominciò ad essere commercializzata dalle principali case produttrici, ma una verticalizzazione nell'uso si è avuta solo a partire dal 1992. La ionizzazione a pressione atmosferica consiste nella nebulizzazione di una soluzione con formazione di uno spray, liberazione di ioni in fase gassosa dalle gocce dello spray e trasporto degli ioni dalla regione a pressione atmosferica della sorgente di ionizzazione fino alla regione sottovuoto dello spettrometro di massa dove gli ioni entrano per mezzo di un piccolo orifizio (l'orifizio è piccolo per separare la zona a pressione atmosferica dalla quella con il vuoto). Nelle tecniche ESI ed ISI, la nebulizzazione ed il caricamento delle gocce sono due eventi concomitanti. Entrambe producono ioni mediante lo stesso processo noto come "Ion Evaporation", ma differiscono nel meccanismo di formazione delle gocce. Nell'ESI (Figura 18) è il voltaggio applicato alla punta del capillare (nebulizzatore/ionizzatore) rispetto ad un contro elettrodo (plate o interfaccia) a generare e caricare le gocce, mentre nella ISI (Figura 19) la formazione delle gocce è principalmente dovuta al flusso di un gas di nebulizzazione (azoto) coassiale allo spray che consente la formazione di uno spray migliore e quindi un migliore di processo di "ion evaporation". Esiste inoltre una particolare variante della sorgente IonSpray chiamata TurboIonSpray (Figura 20) in cui il turbo gas caldo fluisce perpendicolarmente allo spray favorendo l'evaporazione del solvente ed aumentando l'efficienza del processo "ion evaporation".

Figura 18. Sorgente Electrospray classica

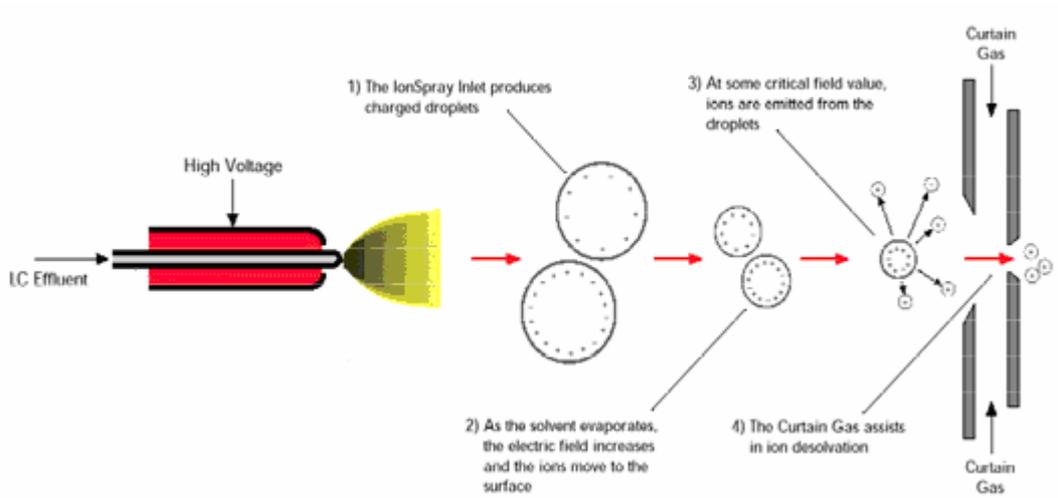


Figura 19. Sorgente ionspray: electrospray pneumaticamente assistita.

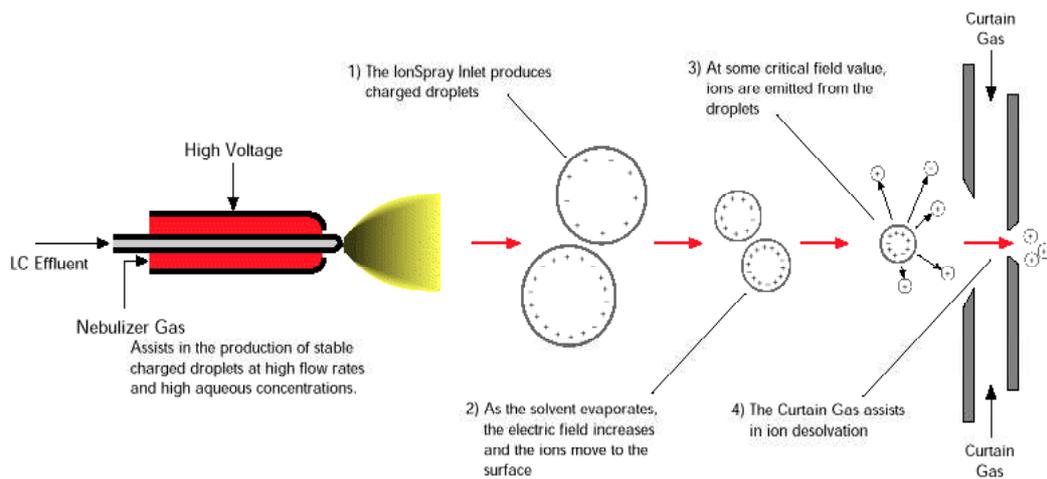
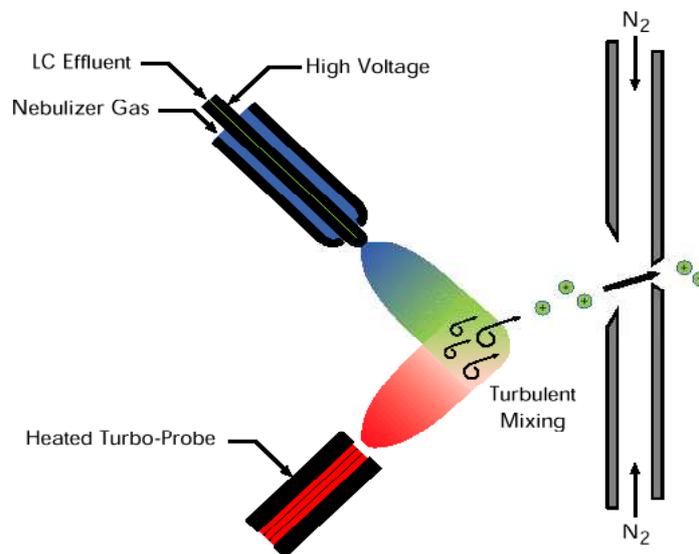


Figura 20. Sorgente TurboIonSpray



In entrambi i casi la prima ionizzazione avviene in soluzione per mezzo di reazioni acido-base di Lewis che danno ioni N^+P^+ ; una parziale separazione di carica (meccanismo elettroforetico) avviene all'interno del capillare, ove, in ionizzazione positiva, le cariche negative vengono in parte rimosse mediante scarica elettrochimica degli ioni N^- contro le pareti metalliche, mentre gli ioni positivi P^+ vengono respinti ed addensati sul fronte del liquido, che assume una tipica forma conica chiamata "cono di Taylor". Per campi elettrici sufficientemente elevati, quando la repulsione elettrostatica supera la tensione superficiale, il cono diventa instabile e dalla sua estremità viene emesso un filamento liquido dal diametro di pochi micron, da cui si staccano gocce micrometriche arricchite di cariche positive. Le gocce cariche generate viaggiano nella sorgente attraverso un gas denso in controcorrente (curtain gas) attirato dal controelettrodo planare di polarità opposta al capillare. Durante tale migrazione, esse subiscono una progressiva diminuzione delle loro dimensioni a causa dell'evaporazione del solvente, favorita da un moderato riscaldamento (50-70°C, temperatura cui è impostata l'interfaccia), mentre sono contemporaneamente soggette a forze di taglio del flusso gassoso. Come risultato di entrambe gli effetti, le gocce si deformano dando luogo ad elevati campi elettrici locali nelle protrusioni superficiali, la cui esplosione coulombiana genera un getto di microgocce nei casi in cui la deformazione e la repulsione elettrostatica superano la tensione superficiale (limite di stabilità di Raleigh o limite superiore di carica per una goccia). Mediante questa fissione irregolare, da ciascuna goccia dell'aerosol primario ($r \sim 0.5-1.5 \mu\text{m}$) viene portato via il 15% della carica e solo il 2% della massa, che viene ridistribuito tra una ventina di gocce figlie, aventi un raggio pari a circa 1/10 di quello della goccia madre ($r \sim 0.1 \mu\text{m}$) e quindi caratterizzate da una più elevata densità superficiale di carica; sia le gocce prodotte sia la goccia d'origine continueranno ad evaporare ed esplodere fino a raggiungere un raggio di circa 10 nm, in corrispondenza del quale si suppone che la rimozione dell'eccesso di carica non avvenga più per esplosione coulombiana al limite di Rayleigh, ma mediante il processo di Ion Evaporation, studiato da Thomson ed Iribarne, per emissione diretta di ioni in fase gassosa dalla superficie della goccia quando il suo campo elettrico superficiale diventa elevato ($r \sim 8\text{nm}$ e ~ 70 cariche elementari). Un altro meccanismo, in realtà il primo ad essere ipotizzato in ordine di tempo (Dole, 1968), propone che soltanto gocce dal raggio di 1nm, contenenti un solo ione, per evaporazione del solvente producano ioni in fase gassosa. Questo modello, noto come teoria del singolo ione nella goccia (SIDT), fu ripreso ed attentamente studiato da Röllgen nel 1989, in controversia con la ion evaporation. In Figura 21 è rappresentato il meccanismo di

desolvatazione che avviene in una sorgente ES nella quale le molecole vengono contemporaneamente ionizzate, desolvate e portate in fase gassosa.

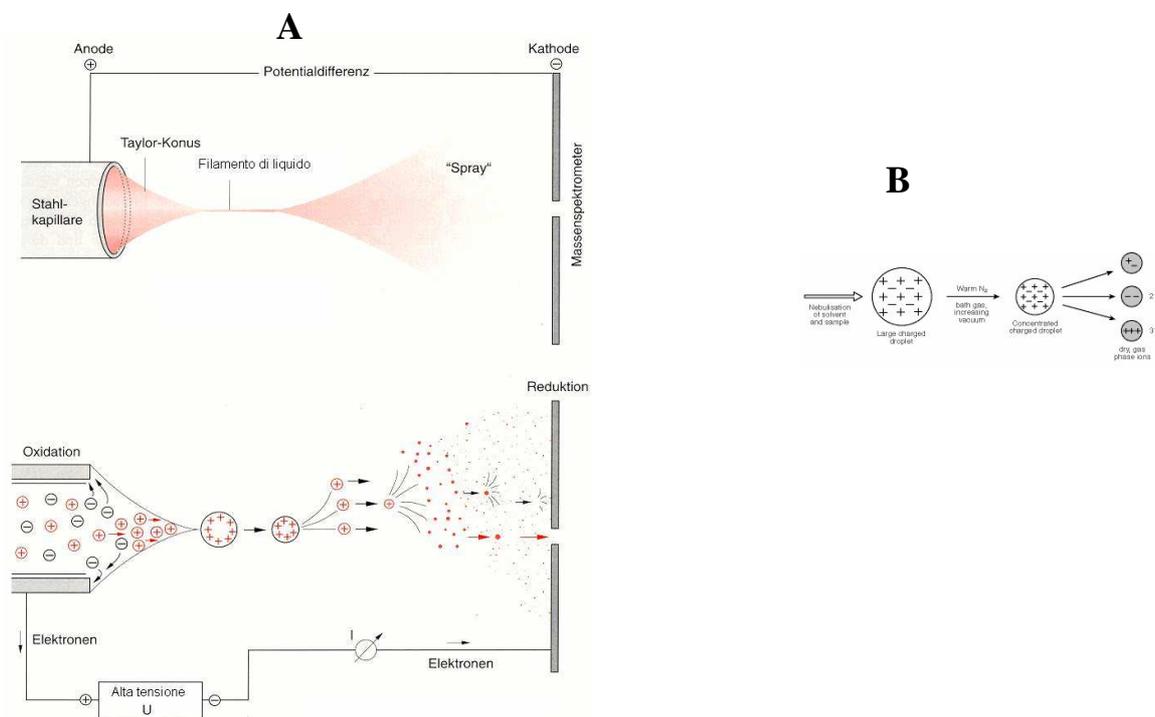


Figura 21. Rappresentazione del processo di desolvatazione che avviene all'interno di una sorgente ESI. Nella parte A della figura è rappresentato il meccanismo con il quale all'interno della sorgente grazie alla differenza di potenziale applicata si forma il fascio di ioni. Nella parte B è rappresentato il meccanismo di desolvatazione delle particelle cariche.

Nell'interfaccia APCI (Figura 22), le gocce sono formate prima della ionizzazione da una combinazione tra un tubo caldo di desolvatazione a 400-500°C (da cui "Heated pneumatic nebulizer", altro nome con cui questa interfaccia è nota) un nebulizzatore pneumatico concentrico. La desolvatazione dell'aerosol è completata all'interno del tubo caldo se la temperatura è sufficientemente alta. Nonostante la temperatura relativamente alta del riscaldatore la degradazione termica è minima in quanto il calore fornito viene utilizzato per la vaporizzazione del solvente e la temperatura del campione non supera in genere i 100-120°C e per un periodo di tempo molto breve. Il campione nebulizzato viene trasportato da una gas chiamato "make up" gas o "sheath" gas nella regione della scarica a corona, generata da un ago settato ad un voltaggio (3-6kV). La ionizzazione dell'analita in fase gassosa è indotta da processi identici a quelli osservati nelle sorgenti a ionizzazione chimica: gli elettroni della scarica a corona ionizzano per impatto elettronico le molecole del gas di

nebulizzazione e “make up” dando ioni primari che ionizzano a loro volta le molecole del solvente dando ioni secondari, che infine ionizzano le molecole dell’analita. Questa sorgente trova particolare utilizzo per l’analisi di sostanze poco polari che non hanno tendenza a ionizzarsi in soluzione.

Nella sorgente APPI l’analita subisce la stessa nebulizzazione della sorgente APCI ma una diversa ionizzazione. Non viene ionizzato da una scarica a corona, ma in seguito a irradiazione con una lampada UV, mediante l’utilizzo di una luce di opportuna lunghezza d’onda.

Dunque mentre l’ES classica opera a flussi di 1ul/min non compatibili con i flussi dell’HPLC, l’IS consente di lavorare a flussi di 200ul/min, la TurnoIonSpray a flussi di 1ml/min e la sorgente APCI permette di arrivare addirittura a 2ml/min. Di contro, per questa sorgente, l’impiego di flussi troppo bassi come 200ul/min non consentirebbe una efficiente ionizzazione.

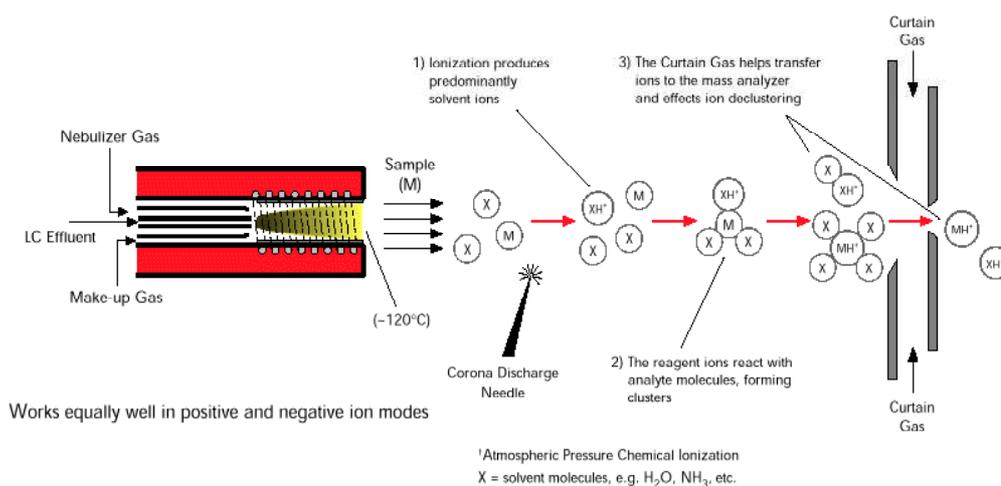
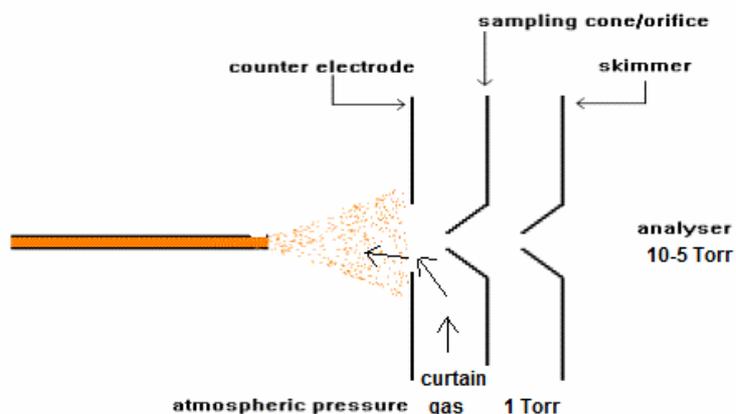


Figura 22. Sorgente APCI o Heated Nebulizer (HN).

In tutte le tecniche API, questi ioni, nudi o parzialmente solvatati, sono accelerati attraverso un gradiente di campo elettrico prima nell’interfaccia, dove sono desolvati mediante collisioni con il curtain gas in controcorrente, poi attraverso un orifizio entrano nella regione a vuoto intermedio e poi, attraverso lo skimmer, in quella ad alto vuoto dello spettrometro di massa dove sono analizzati (Figura 23).

Figura 23. Percorso degli ioni verso l'analizzatore.



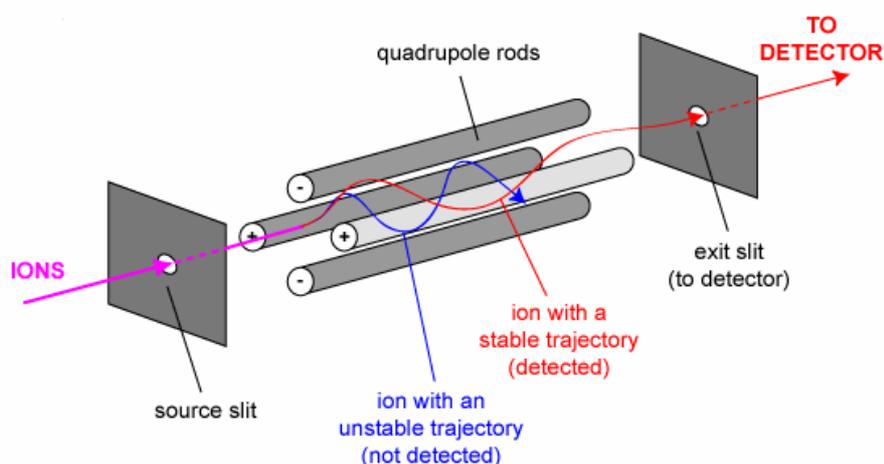
Le ionizzazioni operate sono “soft” e producono ioni quasi-molecolari $[M+H]^+$ (positive ion mode) e $[M-H]^-$ (negative ion mode). Aumentando il potenziale dell'orifizio, tuttavia, aumenta l'energia cinetica di questi ioni che per collisione con le molecole del curtain gas generano frammenti caratteristici. Questo modo di operare, noto come Collision Induced Decomposition (CID) o Cone Voltage Fragmentation (CVF), è importante per ottenere informazioni strutturali e quindi per il riconoscimento di un analita.

Passiamo ora all'analizzatore presente in uno spettrometro di massa. Anche in questo caso esistono vari tipi di analizzatori che differiscono tra loro oltre che per i principi fisici su cui si basano, per la velocità con cui sono in grado di separare i singoli ioni, per la capacità di discernere tra due picchi con un determinato Δm (risoluzione) ed infine per il range di massa che riescono ad analizzare. I possibili analizzatori di massa sono i settori magnetici, settori elettrici, elettromagnetici, il tempo di volo, la trappola ionica ed il quadrupolo. Tra questi il quadrupolo è spesso accoppiato ad una sistema cromatografico in quanto è capace di fare scansioni veloci di m/z compatibili con la velocità di un picco cromatografico.

Il quadrupolo (Figura 24) è costituito da quattro barre in acciaio, accoppiate a due a due. A due barre diametralmente opposte viene applicato un potenziale $+(U+V\cos(\omega t))$ mentre alle altre due barre viene applicato un potenziale $-(U+V\cos(\omega t))$, dove U è un potenziale costante e V alternato a radiofrequenza. Lo ione entra nell'analizzatore parallelamente all'asse z , ed è spinto dai campi elettrici continuo ed oscillante a seguire una traiettoria a spirale. Esso è sottoposto ad un potenziale variabile nel tempo, ottenuto variando o la corrente alternata o quella continua e tenendo costante l'altra. La combinazione di U e V rende stabile la traiettoria di un singolo ione con un determinato valore di m/z facendolo passare attraverso le

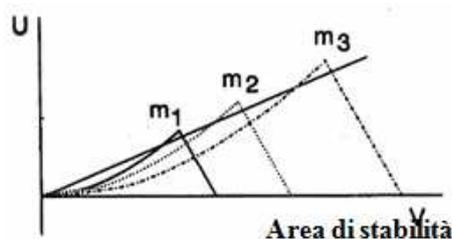
barre deviando le traiettorie di tutti gli altri ioni, che si vanno a scaricare sulle barre in acciaio (se vi fosse solo corrente alternata tutti gli ioni sarebbero focalizzati al centro e procederebbero dritti, al contrario se fosse presente solo la corrente continua andrebbero tutti a neutralizzarsi sulle barre e non vi sarebbe trasmissione). All'estremità del quadrupolo gli ioni attraversano un'altra fenditura ed impattano sul collettore di ioni, che misura elettronicamente l'intensità del fascio ionico collidente. Tale tipo di analizzatore è anche chiamato analizzatore a filtro di massa in quanto per determinati valori corrente continua e alternata passa un solo valore m/z , la variazione di questi valori consente di effettuare quella che viene definita una scansione di massa.

Figura 24. Traiettoria degli ioni all'interno del quadrupolo.



Il campo di stabilità dello ione è dettato da equazioni differenziali di ordine superiore che danno luogo al grafico riportato in Figura 25.

Figura 25. Diagramma di stabilità degli ioni all'interno del quadrupolo



Poiché le zone di stabilità si sovrappongono si preferisce lavorare lungo la retta U/V costante perdendo un po' in sensibilità ma aumentando la risoluzione.

Il detector è generalmente un moltiplicatore di ioni secondari che amplifica la debole corrente ionica in arrivo con un sistema di dinodi connessi tra loro attraverso un sistema di

resistenze.

Una tipologia di analizzatore quadrupolare particolarmente usata è il cosiddetto triplo quadrupolo (Figura 26), chiamato così perché costituito da quadrupoli in serie che permettono di fare esperimenti diversi da quelli che si possono ottenere con un singolo quadrupolo.

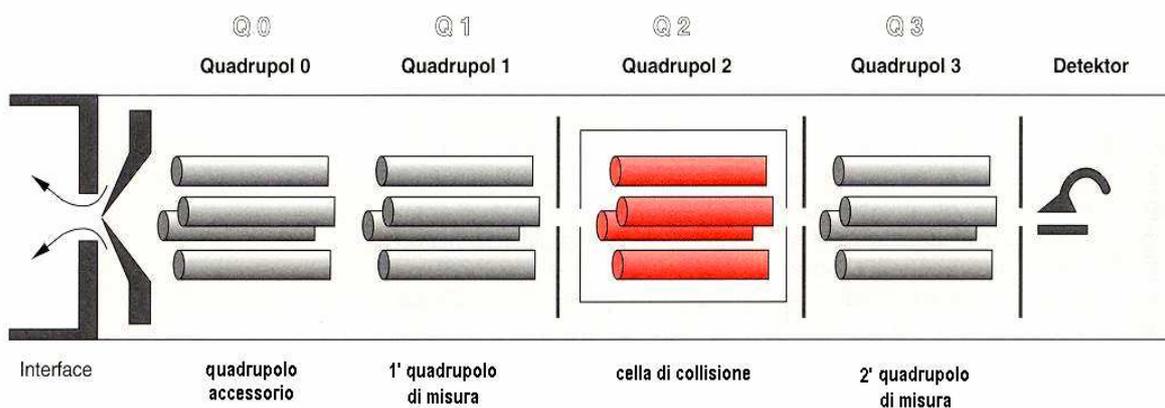


Figura 26. Schema di uno strumento a triplo quadrupolo. Il quadrupolo raffigurato in rosso rappresenta la cella di collisione

Il quadrupolo Q0 ha solo la componente di corrente alternata e funziona da focalizzatore di ioni verso il quadrupolo Q1 che funziona invece da filtro di massa. Anche il quadrupolo Q2 possiede solo corrente alternata e funge da cella di collisione in cui gli ioni vengono frammentati per impatto con un gas inerte.

Con uno strumento a triplo quadrupolo sono effettuabili i seguenti esperimenti:

Product Ion Scan: è quella più utilizzata e prevede che uno ione (detto “parent ion”, ma oggi definito più correttamente “precursor ion”), selezionato dal primo analizzatore di massa (quadrupolo o settore), venga opportunamente frammentato nella cella di collisione ed i frammenti così generati (detti “daughter ion”, ma oggi definiti “product ion”) siano caratterizzati dal secondo analizzatore. Nel caso di configurazione strumentale a triplo quadrupolo si ha Q₁ fisso sul precursore, Q₂ come cella di collisione, Q₃ in scansione su precursore e frammenti (Figura 27). Gli spettri CID ottenuti con il singolo quadrupolo sono un tentativo di riprodurre questo tipo di operazione con la MS/MS.

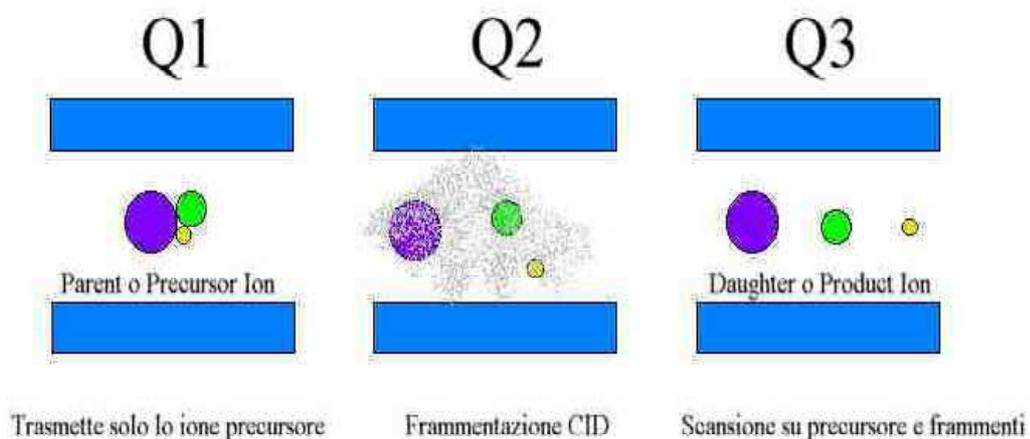


Figura 27. Schema di un esperimento in “product ion scan”.

Precursor Ion Scan: nota anche come “parent ion scan”, inverte i compiti dei quadrupoli rispetto alla prima tecnica, esplorando quali ioni precursori producono per scissione un particolare e specifico frammento. Si ha Q_1 in scansione sui precursori, Q_2 frammenta, Q_3 fisso sul frammento comune (Figura 28). Questa tecnica è utilizzata per l’identificazione di omologhi e metaboliti.

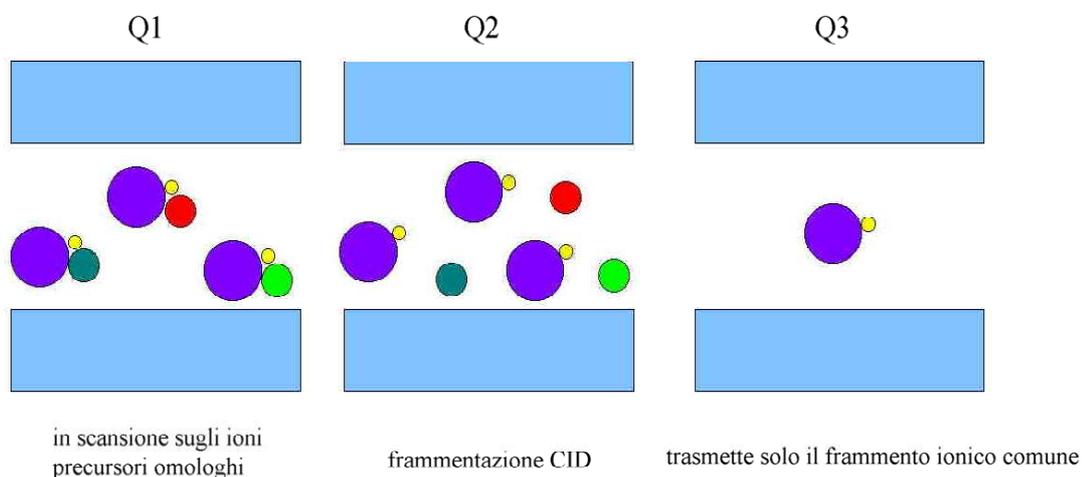


Figura 28. Schema di un esperimento in “precursor ion scan”.

Neutral Loss Scan: è una tecnica più raffinata della precedente che consente di esplorare con il primo quadrupolo quegli ioni precursori che per scissione possono produrre frammenti ionici con masse diverse per perdita dello stesso frammento neutro (Q_1 in scansione sui precursori, Q_2 frammenta, Q_3 in scansione sui frammenti). Anche questa tecnica è utilizzata

per l'identificazione di omologhi e di metaboliti.

Multi-Reaction-Monitoring (MRM): in questo caso il quadrupolo Q_1 è fisso sullo ione precursore, Q_2 frammenta ed il quadrupolo Q_3 è fisso sullo ione frammento (Figura 28); questa modalità operativa è molto utilizzata per dosaggi quantitativi.

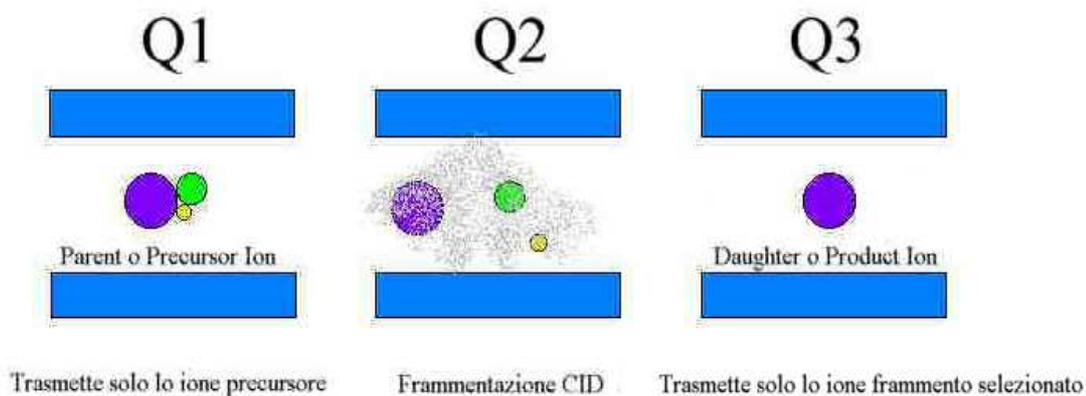


Figura 28. Schema di un esperimento in "MRM".

Nella MS/MS la resa di ioni che giunge al detector è minore rispetto a quella di un singolo quadrupolo per la maggior manipolazione che subiscono durante la trasmissione; tuttavia a causa della maggiore selezione ionica il rapporto S/N è senz'altro maggiore e di conseguenza anche la sensibilità.

2. Parte sperimentale : sviluppo del metodo per il dosaggio del 24S-idrossicolesterolo nel siero

2.1 Reagenti e prodotti chimici

Gli standard certificati del 24S-idrossicolesterolo (Figura 29) e del 24-idrossicolesterolo-d6 racemo usato come standard interno (SI), sono stati acquistati in polvere (da 1mg ciascuna) dalla Avanti Polar Lipids. L'Idrossido di potassio, il cloruro di sodio e il toluene sono stati acquistati dalla Sigma mentre, il metanolo, l'isopropanolo, l'etanolo e l'acetonitrile sono stati forniti dalla J.T. Baker. L'acqua deionizzata è stata prodotta in laboratorio mediante l'apparecchio Milli-Q Plus. Le provette in pyrex con tappo in teflon utilizzate durante la fase di purificazione del campione dalla matrice biologica, sono state acquistate dalla Laboindustria; le provette in teflon per lo stoccaggio delle soluzioni sono state acquistate dalla Eppendorf. Le vials in teflon con fondo interno conico da 200 μ L e tappo in teflon sono state acquistate dalla Waters.

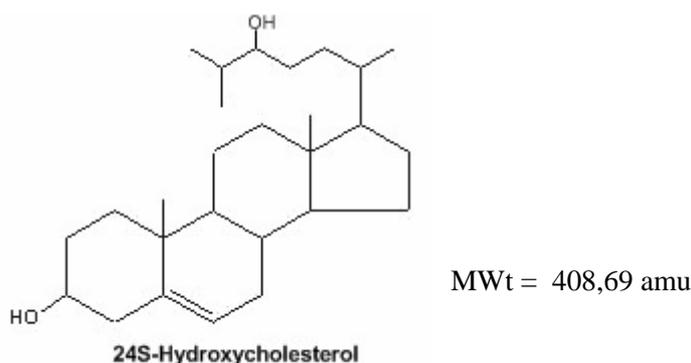


Figura 29. Formula di struttura del 24S-idrossicolesterolo.

2.2 Strumentazione

I campioni sono stati analizzati con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo dell'Applied Biosystems, modello API 3000, con sorgente APCI, accoppiato ad un sistema cromatografico UPLC Dionex, modello Ultimate 3000 con autocampionatore.

Per la corsa cromatografica è stata utilizzata una colonna cromatografica Restek Pinnacle DB C18 da 10 cm, con diametro interno 2.1mm e larghezza dei pori di 1.9 μ m. Per l'analisi ed elaborazione del dato è stato usato il software in dotazione allo strumento Analyst 1.4.2.

2.3 Preparazione delle soluzioni standard

Le soluzioni madri di 24S-idrossicolesterolo e dello standard interno sono state preparate entrambe ad una concentrazione di 1mg/mL in toluene e conservate a -80°C fino ad utilizzo. Le soluzioni di lavoro utilizzate per la curva di calibrazione sono state preparate per diluizioni successive in isopropanolo dalla soluzione madre e conservate a -80°C fino al momento del loro utilizzo. La soluzione di standard interno utilizzata per l'analisi (10µg/mL) è stata preparata in isopropanolo per diluizione dalla soluzione madre e conservata anch'essa a -80°C.

2.2 Preparazione della curva di calibrazione

Tutte le determinazioni sono state effettuate per confronto con una curva di calibrazione a sei punti le cui concentrazioni finali erano di 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 ng/ml. La concentrazione finale di standard interno era di 400 ng/ml. Tutti i punti di curva sono stati ottenuti portando a secco, sotto flusso di azoto a 37°C, 200 µL delle soluzioni di lavoro, in modo tale da eliminare il toluene residuo presente e ricostituendo ogni punto con 200 µL di una soluzione acetonitrile/metanolo (30/70 v/v).

2.3 Preparazione del campione

Per l'analisi del 24S-Idrossicolesterolo sono stati utilizzati sieri provenienti in ghiaccio secco dall'istituto di Medicina Interna dell'Università di Ferrara e conservati a -80°C fino all'utilizzo. L'analisi è stata effettuata su una aliquota pari a 500 uL di campione. Per l'estrazione dalla matrice biologica è stato utilizzato un metodo pubblicato da DeBarber et al. modificato per le esigenze di laboratorio: al campione da analizzare sono stati aggiunti, dopo addizione di 5 µL di SI 10 µg/mL, 2ml di KOH 1M in etanolo al 90% e si è effettuata la saponificazione a 37°C per 1 h. Al termine il campione è stato raffreddato sotto acqua corrente per interrompere la reazione ed è stato aggiunto 1ml di NaCl saturo. Si è proceduto ad una estrazione con solvente aggiungendo al campione 3.5 ml di esano. Il campione è stato centrifugato per 10 min a temperatura ambiente a 4500 rpm e la fase organica trasferita in un'altra provetta dove il solvente è stato fatto evaporare sotto flusso di azoto a 37°. Al fine di garantire una estrazione efficiente si è proceduto ad una seconda aggiunta di una aliquota

di 3.5 mL di esano e la fase organica recuperata, dopo un procedimento analogo a quello già descritto, è stata aggiunta alla frazione precedente. Il residuo è stato solubilizzato con 125 μ L di una soluzione acetonitrile/metanolo (30/70 v/v) e posto nell'autocampionatore dell'UPLC pronto per essere analizzato in LC-MS/MS.

2.4 *Analisi strumentale*

10 μ L di campione sono stati iniettati in colonna mediante autocampionatore. L'analisi in UPLC è stata eseguita in gradiente utilizzando come fasi mobili MeOH/CH₃CN/H₂O 45/45/10 + 0,1 % di acido acetico (fase A) e CH₂Cl/MeOH (20/80 v/v) (fase B). Il gradiente di eluizione rimaneva per i primi 5 min al 100% della fase A e successivamente la fase B aumentava dallo 0% al 100% in 10 minuti, con un tempo di equilibratura tra una iniezione e l'altra pari a 5 minuti. La colonna era riscaldata alla temperatura di 50°C e il flusso di esercizio del sistema era di 800 μ L/min. I tempi di eluizione del 24S-idrossicolesterolo e dello standard interno erano rispettivamente 1,74 e 1,72 minuti. Il 24S-idrossicolesterolo e lo standard interno, eluiti dalla colonna, venivano mandati, attraverso un tubo di peak, all'interno della sorgente APCI dello spettrometro di massa.

L'analisi in spettrometria di massa è stata effettuata in modalità *multiple reaction monitoring* (MRM) in modalità positiva, analizzando la transizione m/z 385.4/367.5 per il 24S-idrossicolesterolo e m/z 391.4/373.5 per lo standard interno. I parametri strumentali dello spettrometro di massa sono stati ottimizzati per avere il massimo segnale sia del 24S-idrossicolesterolo sia dello standard interno. Per l'ottimizzazione di tali parametri sono state effettuate preventivamente analisi in "Q1 scan" sia per il 24S-idrossicolesterolo sia per lo standard interno, introducendo il campione all'interno dello spettrometro mediante una pompa ad infusione ad un flusso costante di 10 μ L/min. In tal modo è stato possibile ottimizzare tutti i parametri strumentali dipendenti dalla massa e dalla struttura chimica del composto in questione (Tabella 3).

3. Risultati e discussione

In Figura 29 ed in Figura 30 sono riportati rispettivamente gli spettri ottenuti in “Q1 scan” ed in “product ion scan” del 24S-idrossicolesterolo e dello standard interno. Lo ione 385.4 a m/z rappresenta lo ione quasi molecolare $[M+H-H_2O]^+$ del 24S-idrossicolesterolo mentre lo ione a 367.5 m/z rappresenta il frammento caratteristico ottenuto durante l’esperimento di massa-massa. Per lo standard interno lo ione ottenuto a 391.4 m/z rappresenta ione quasi molecolare $[M+H-H_2O]^+$ mentre lo ione a 373.5 m/z rappresenta il frammento ottenuto dall’esperimento di massa-massa. In Tabella 3 sono riportati i parametri strumentali ottimizzati per l’analisi in massa del 24S-idrossicolesterolo.

In Figura 31 è riportato il cromatogramma e “l’extract ions chromatogram” (XIC) di un campione reale. Lo XIC estratto dal cromatogramma dimostra come sebbene i picchi di 24S-idrossicolesterolo e di standard interno in parte coeluiscono grazie all’esperimento in MRM si possono distinguere i segnali relativi ai due composti, la traccia blu è relativa al 24S-idrossicolesterolo, mentre quella rossa allo standard interno.

Per quanto riguarda la cromatografia, abbiamo sperimentato che l’utilizzo di una seppur piccola percentuale di diclorometano nella fase organica garantiva un’ottima pulizia della colonna e contropressioni entro i limiti strumentali, cosa che non accadeva con fasi organiche, anche riportate in letteratura, più comunemente utilizzate nell’accoppiamento HPLC-MS. Tali solventi infatti, impedivano, per occlusione, l’uso della stessa colonna per l’analisi di numerosi campioni e necessitavano di flussi più bassi di quelli stabiliti inizialmente per l’analisi, a causa di una elevata contropressione, talvolta anche oltre i limiti strumentali consentiti, con conseguente aborto dell’analisi. E’ stato inoltre dimostrato che era possibile effettuare l’analisi anche con una colonna Dionex C18, Acclaim, anch’essa da 10 cm, con diametro interno 2.1mm e larghezza dei pori di 1.9 μm , ma con risultati meno soddisfacenti in relazione sia alla pulizia della colonna stessa, sia al rapporto S/N che, per la colonna Resteck, è risultato più elevato.

Parametro	Valore	Parametro	Valore (V)	Parametro	Valore (V)
NEB	13	DP	26	ST	-15
CUR	8	FP	150	IQ2	-40
CAD	7	EP	10	CE	-15
TEM	450°C	IQ1	-10.5	CXP	10

Tabella 3. Parametri strumentali ottimizzati per l’analisi in massa del 24S-idrossicolesterolo.

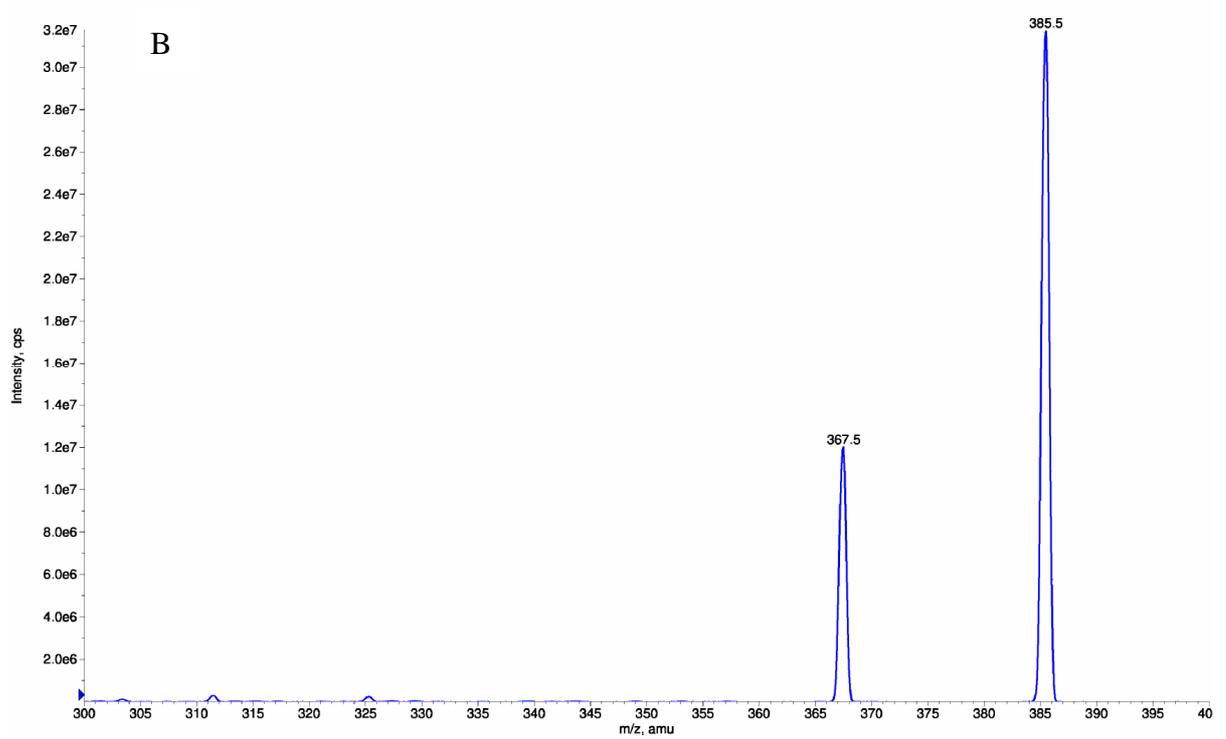
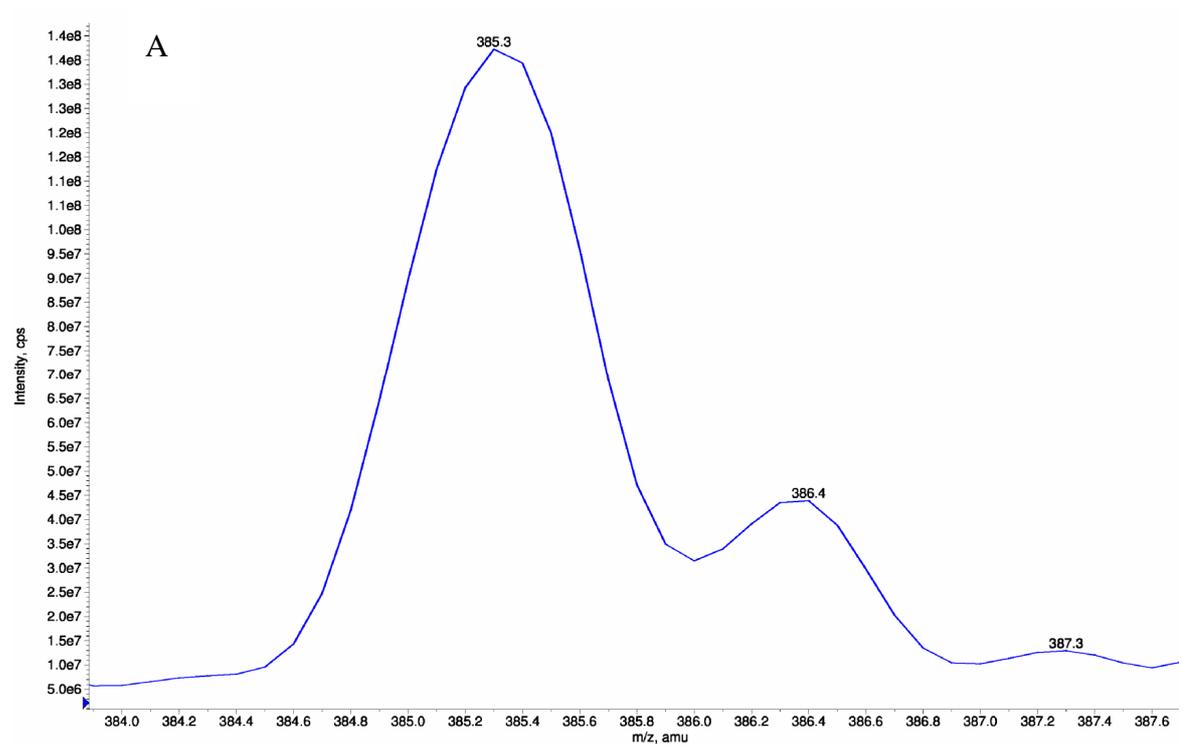


Figura 29. Spettro in Q1 scan (A) e in product ion scan (B) del 24S-idrossicolestorolo.

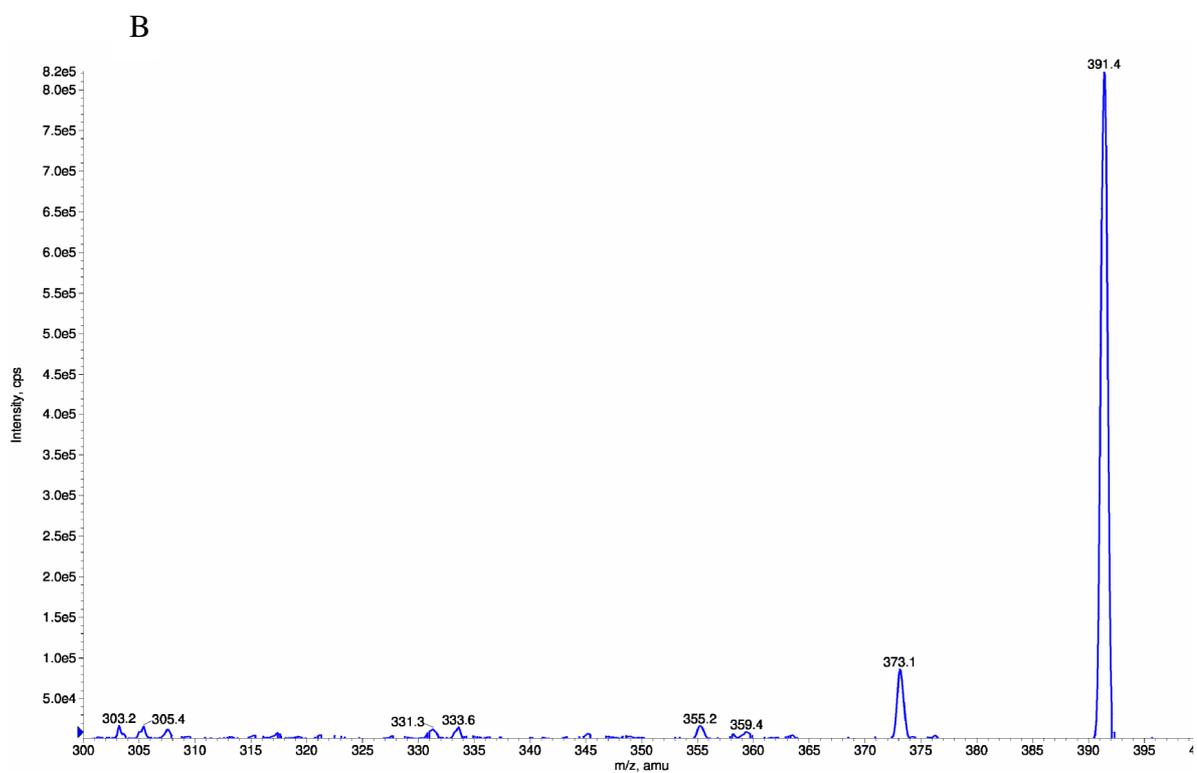
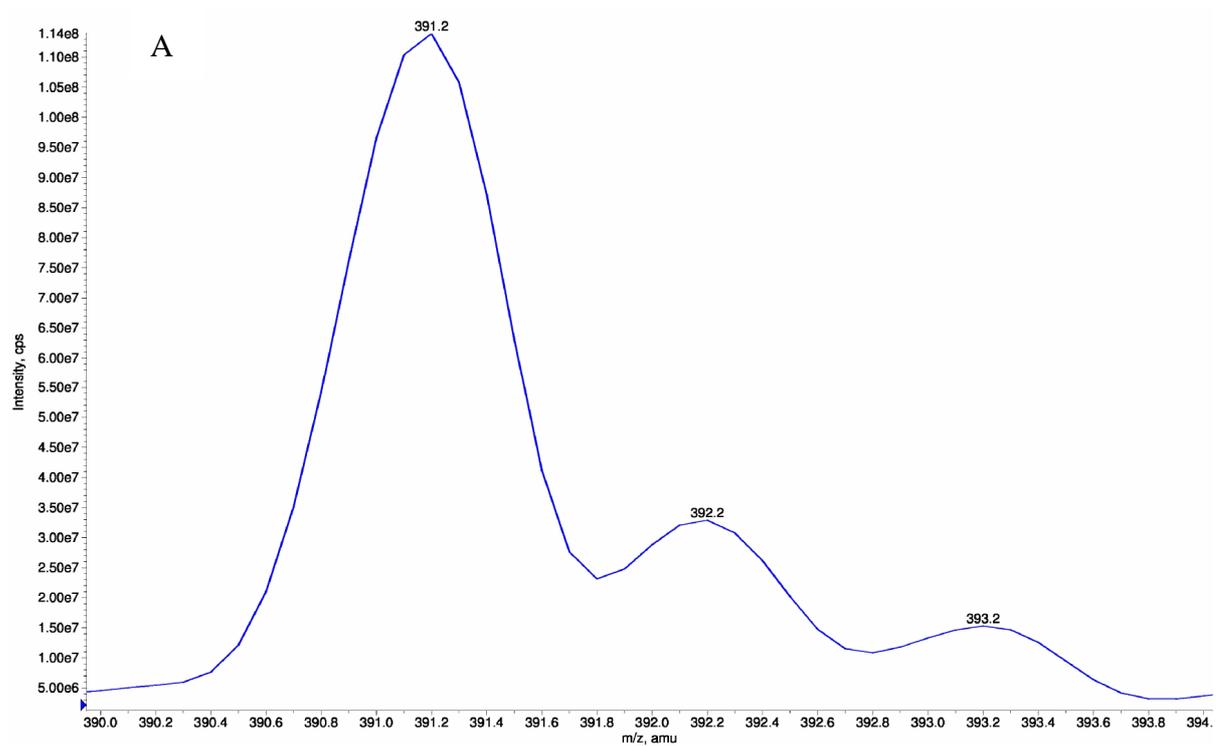


Figura 30. Spettro in Q1 scan (A) e in product ion scan (B) dello standard interno.

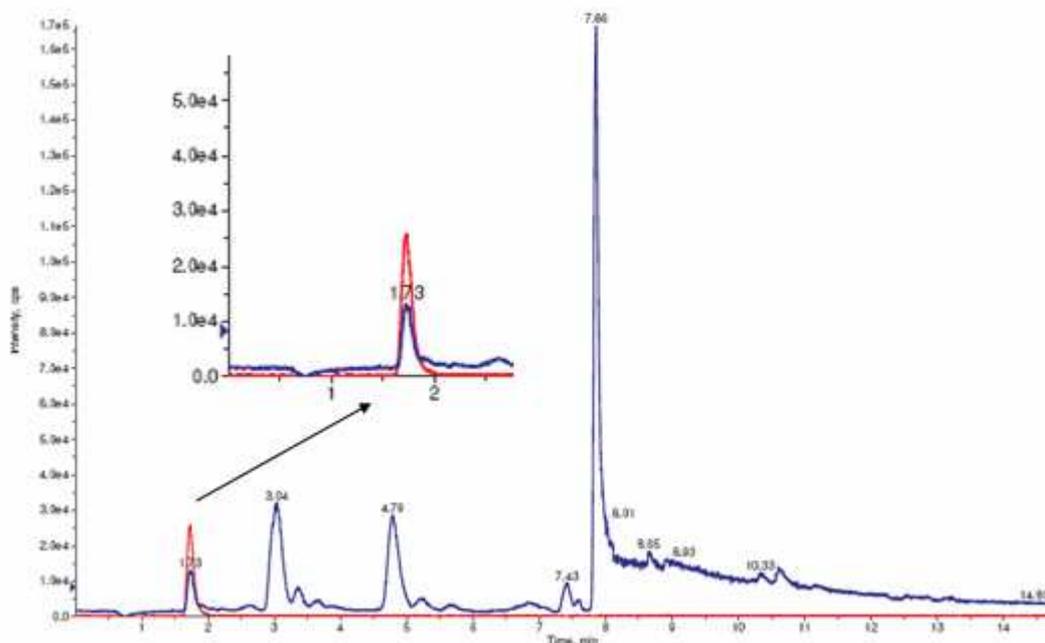


Figura 31. Cromatogramma in XIC di un campione di siero.

3.1 Validazione del metodo

Nella fase preliminare dello sviluppo del metodo di analisi è stata verificata la possibilità di dosare i campioni su una curva costruita in solvente e non estratta da matrice biologica. Questo perché essendo il 24S-idrossicolestero endogeno, per ogni curva in matrice sarebbe stato necessario il calcolo per estrapolazione della concentrazione di 24S-idrossicolestero presente e conseguentemente la modifica delle concentrazioni reali della curva e solo successivamente il dosaggio dei campioni. Tale verifica è stata effettuata costruendo una curva su un pool di siero di volontari del Policlinico di Tor Vergata, mediante supplementazione di concentrazioni note di standard (sei punti di concentrazione finale 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 ng/ml e concentrazione finale di standard interno di 400 ng/ml) al fine di ottenere, dopo l'estrazione effettuata con la stessa procedura descritta per i campioni, le concentrazioni corrispondenti della curva in solvente. Dal confronto le due curve sono risultate parallele e quella in siero traslata più in alto per la presenza del 24S-idrossicolestero endogeno, ciò dimostra la fattibilità del dosaggio dei campioni sulla curva in solvente.

Di seguito, in Figura 32, sono riportati i confronti effettuati fra tre curve estratte da matrice supplementata e tre rispettive curve costruite in solvente. Le curve sono state

costruite riportando per ogni punto il rapporto delle aree del 24S-idrossicolestrolo e dello standard interno (ascisse) in funzione del il rapporto tra la concentrazione del 24S-idrossicolestrolo e quella a dello standard interno (ordinate), utilizzando come modello per la regressione lineare l'equazione $y = mx+q$. Le curve sono state inoltre pesate secondo la funzione $1/x$ comunemente adottata per i metodi bioanalitici. In tutti i casi le due curve sono risultate parallele.

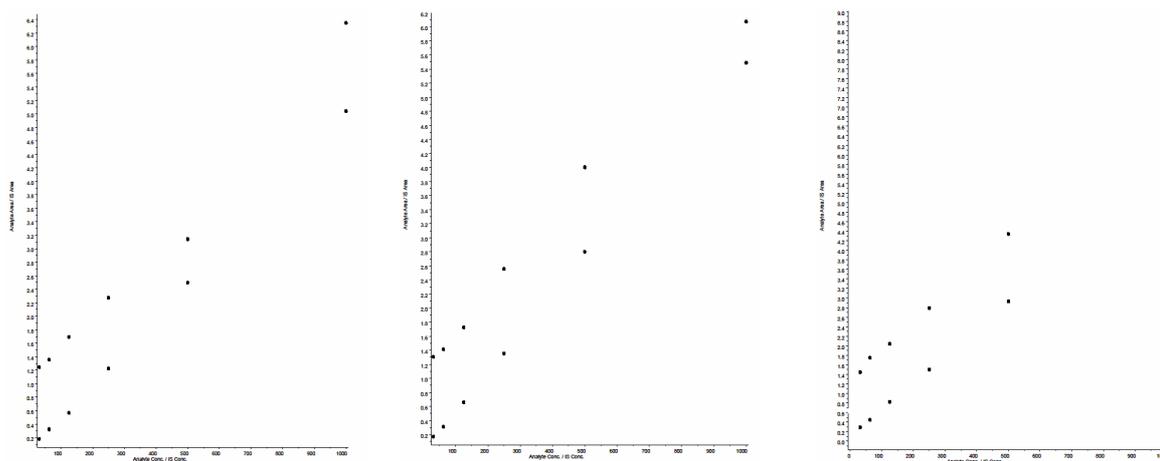


Figura 32. Confronto tra curve estratte da matrice e curve costruite in solvente.

Sulla media delle tre curve in solvente usate per il confronto con le curve in matrice, è stata studiata la linearità, l'accuratezza, la precisione inter-day, la sensibilità, il limite di rilevabilità e di quantificazione. Tutte le curve sono risultate lineari nel range 31.25-1000 ng/mL con un $r > 0.999$. L'accuratezza del metodo e la precisione interday su tutto il range, sono risultate rispettivamente comprese tra il 95.81% ed il 108.5% e tra lo 0.6% e 11.96%, come mostrato in Tabella 4.

In Figura 33 è riportata una tipica curva di calibrazione utilizzata per il dosaggio dei campioni. Le curve di calibrazione sono state costruite prima di analizzare ogni serie di campioni.

La sensibilità analitica è stata stimata dalla pendenza della curva di calibrazione e i risultati sono riportati in tabella 3. Il limite di rilevabilità (LOD) per il metodo è 1 ng/mL considerato come segnale per il quale si ha un rapporto segnale/rumore di 3:1 ed il limite di quantificazione (LOQ) è di 5 ng/mL considerato come segnale per il quale si ha un rapporto segnale/rumore di 10:1

Tabella 4. Linearità, accuratezza^a e precisione inter-day espressa come CV% per l'analisi del 24S-idrossicolestolo nel range analitico 31.25-1000 ng/mL

Giorno	Slope	r	Intercetta	Concentrazione (ng/mL)					
				31.5	62.5	125	250	500	1000
1	0.00497	0.9993	0.00876	31.25	63.05	112.16	244.66	501.03	1013.49
2	0.00552	0.9998	0.00669	33.62	58.82	121.89	247.87	509.67	996.87
3	0.00581	0.9996	0.00976	33.47	60.21	125.24	242.08	487.51	1020.23
media	0.00543	0.99957	0,00840	33.91	60.69	119.76	244.87	499.40	1010.03
DS	0.00043			0.6	2.16	6.79	2.9	11.17	11.96
CV %	7.8			1.88	3.56	5.67	1.18	2.23	1.18
				Accuratezza %					
				108.5	97.11	95.81	97.95	99.88	101.00

^a Accuratezza= media della concentrazione di 24S-idrossicolestolo ottenuta pesata per la concentrazione di 24S-idrossicolestolo x100%.

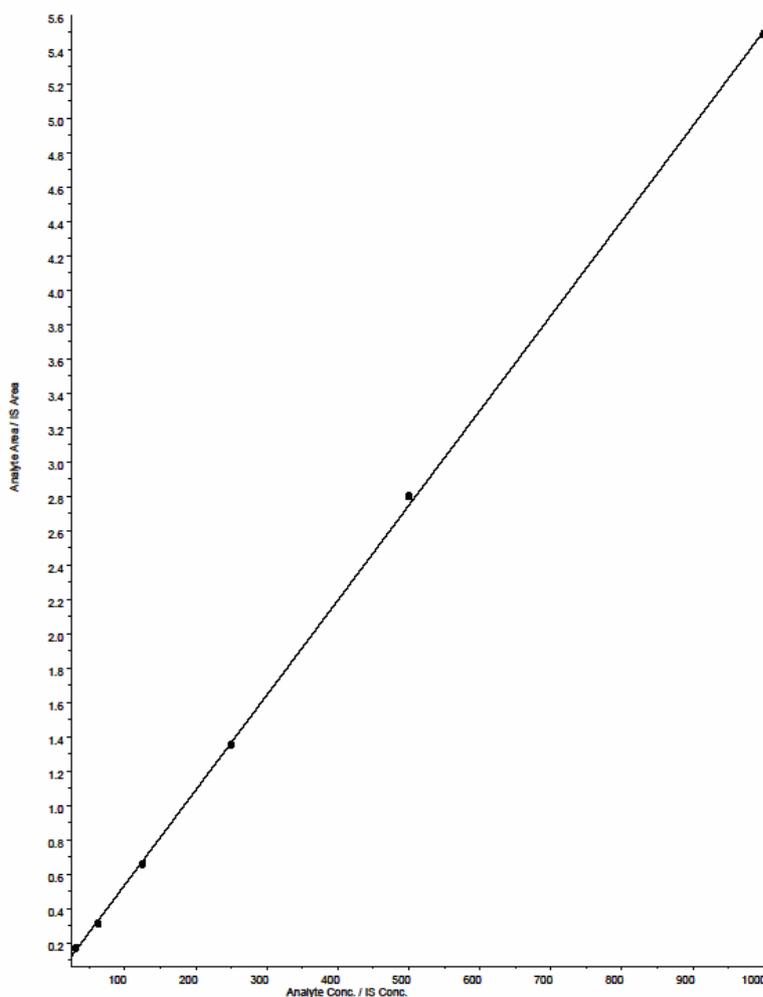


Figura 34. Curva di calibrazione per il dosaggio dei livelli sierici di 24S-idrossicolestolo in LC-MS/MS.

Le prove di riproducibilità intra-day sono state effettuate analizzando nello stesso giorno quattro aliquote dello stesso pool di siero. Ciò è stato ripetuto per quattro giorni successivi (Tabelle 5,6,7,8). Il campione C3 di ogni giorno è stato poi utilizzato per le prove di riproducibilità inter-day (Tabella 9). Il coefficiente di variazione è risultato essere minore dell'8% per le prove intra-day e minore del 5,2% per le prove inter-day. Le prove di riproducibilità sono state effettuate dosando i campioni sia per confronto con la curva in matrice che con quella in solvente (Tabelle 5,6,7,8,9). I valori ottenuti dalle due curve sono risultati paragonabili ad ulteriore conferma della loro equivalenza.

1° giorno		
Campioni	Concentrazione (ng/mL) <i>Curva solvente</i>	Concentrazione (ng/mL) <i>Curva matrice</i>
C1	61.92	65.15
C2	58.49	61.73
C3	58.43	61.67
C4	61.08	64.42
Media	59.58	63.24
DS	1,54	1.56
CV%	2,58	2.47

Tabella 5. Prove di riproducibilità intra-day primo giorno.

2° giorno		
Campioni	Concentrazione (ng/mL) <i>Curva solvente</i>	Concentrazione (ng/mL) <i>Curva matrice</i>
C1	68.75	62.09
C2	59.75	58.08
C3	57.25	58.75
C4	61.75	61.29
Media	59.58	60.23
DS	2.25	1.71
CV%	3.78	2.85

Tabella 6. Prove di riproducibilità intra-day secondo giorno.

3° giorno		
Campioni	Concentrazione (ng/mL) <i>Curva solvente</i>	Concentrazione (ng/mL) <i>Curva matrice</i>
C1	56.70	60.41
C2	53.70	55.05
C3	53.61	53.41
C4	58.45	51.46
Media	55.6	55.1
DS	2.3	3.8
CV%	4.2	6.97

Tabella 7. Prove di riproducibilità intra-day terzo giorno.

4° giorno		
Campioni	Concentrazione (ng/mL) <i>Curva solvente</i>	Concentrazione (ng/mL) <i>Curva matrice</i>
C1	50.76	51.75
C2	51.64	54.87
C3	54.11	57.34
C4	60.95	64.18
Media	54.37	57.0
DS	3,99	4,57
CV%	7,34	8,03

Tabella 8. Prove di riproducibilità intra-day quarto giorno.

Campione C3 (ng/mL)		
Campioni	<i>Curva solvente</i>	<i>Curva matrice</i>
1	58.43	61.67
2	57.25	58.75
3	53.61	53.41
4	54.11	57.34
Media	55.85	57.79
DS	2.04	2.97
CV%	3.65	5.15

Tabella 9. Prove di riproducibilità inter-day sul campione C3.

Le prove di recupero sono state effettuate sulla media delle curve in matrice, calcolando l'accuratezza di ogni punto rispetto al valore teorico costituito dalla somma del valore dell'aggiunta e del contenuto endogeno di 24S-idrossicolestolo, calcolato per estrapolazione. I recuperi su tutto il range, riportati in Tabella 10, sono risultati compresi tra 102,68% e 95,92%.

curva	24S-idrossicolestolo (ng/mL)	Siero supplementato (ng/mL)					
		7,85	15,652	31,25	62,5	125	250
		24S-idrossicolestolo + supplementazione					
1	57,5	65,35	73,152	88,75	120	182,25	307,5
		65,85	68,90	86,03	125,99	195,43	294,97
		100,82	94,23	96,97	104,99	107,08	95,93
2	55,75	63,6	71,402	87	118,25	180,75	305,75
		66,08	69,18	88,6	117,59	161,16	321,59
		103,96	100,42	101,84	99,44	89,16	105,18
3	50,75	58,6	66,4	82	113,25	175,75	358,25
		60,47	70,84	80,97	107,02	160,86	316,53
		103,26	106,72	98,74	94,48	91,52	105,25
		Media dei Recuperi %					
		102,68	100,46	99,17	99,64	95,92	102,12

Tabella 10. Recuperi % calcolati per ogni punto delle tre curve costruite in matrice.

In Figura 35 sono riportati i cromatogrammi relativi al quinto punto della curva in solvente (A), ad un'aliquota del pool di siero usato per la costruzione delle curve in matrice (B) ed al quinto punto della curva supplementata (C).

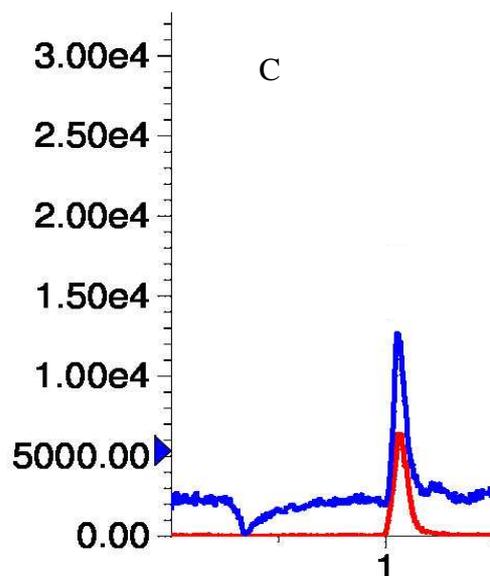
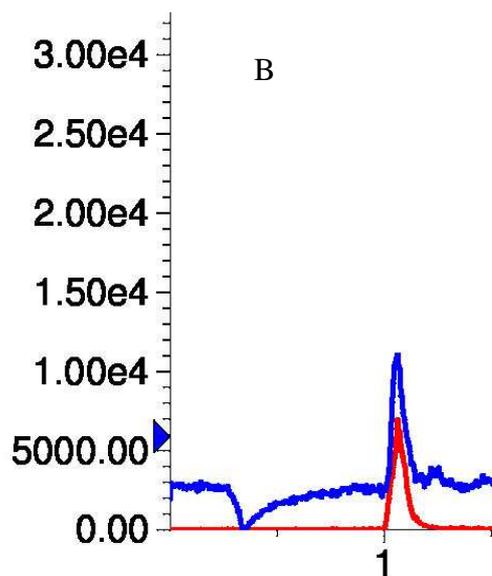
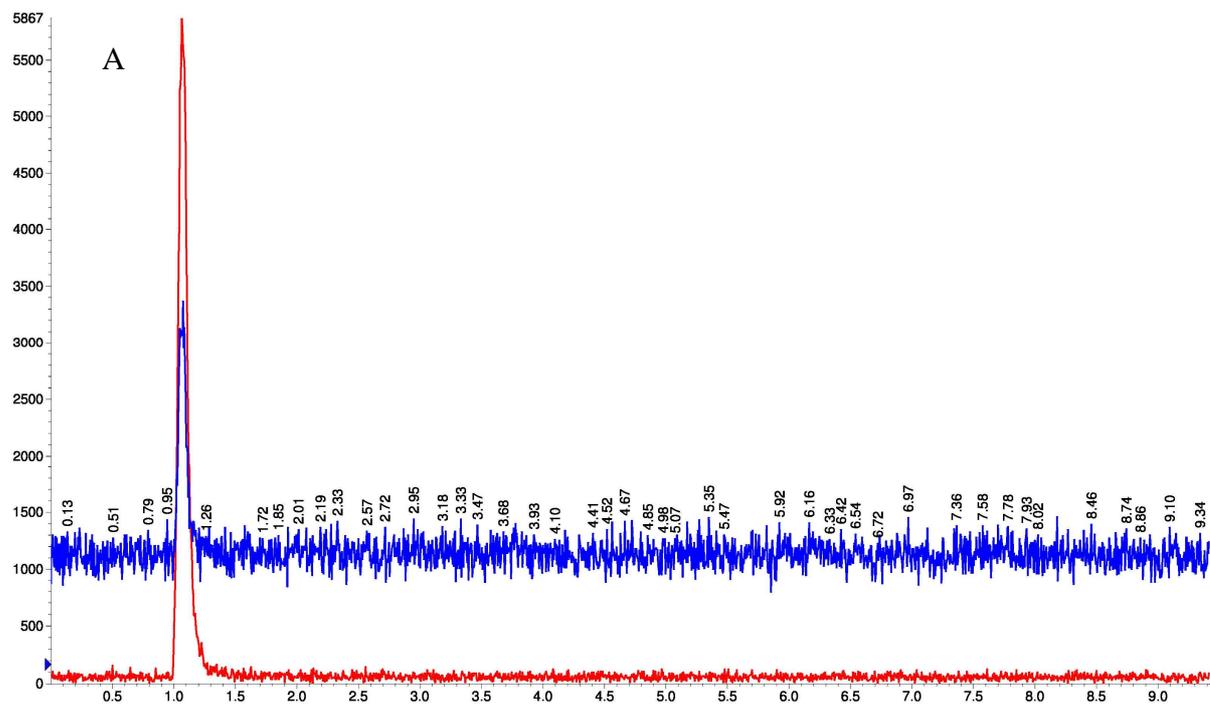


Figura 35. Cromatogrammi relativi al quinto punto della curva in solvente (A), all'aliquota del pool di siero usato per la costruzione delle curve in matrice (B), al quinto punto della curva supplementata (C). In ascissa è riportato il tempo in minuti e in ordinata l'intensità in cps.

3.2 Dosaggio dei campioni

Sono stati valutati i livelli sierici di 24S-idrossicolesterolo in un campione costituito da:

- 20 soggetti anziani affetti da malattia di Alzheimer a esordio tardivo (Late Onset Alzheimer Disease - LOAD) secondo i criteri NINCDS-ARDRA. La loro età media era pari a 77.6 ± 5 anni ed il punteggio medio ottenuto al Mini Mental State Examination (MMSE) era di 20.9 ± 4 trentesimi.
- 20 soggetti anziani con demenza vascolare secondo i criteri NINDS-AIREN. L'età media era 78.1 ± 7 anni ed il punteggio medio ottenuto al MMSE era di 21.6 ± 4 .
- 20 soggetti anziani di controllo sani e con funzioni cognitive nella norma. L'età media era pari a 69 ± 7 anni ed il punteggio medio al MMSE era 27.8 ± 2
- 20 soggetti anziani affetti da MCI. L'età media era pari a 65 ± 6 anni.

In Tabella 11 sono riportati i valori ottenuti.

Tabella 11. Risultati dei campioni analizzati.

Concentrazioni ng/mL 24S-idrossicolesterolo			
Controlli	MCI	VD	LOAD
65,0	60,0	35,2	35,8
73,8	44,8	37,0	34,3
46,1	74,0	45,8	31,0
43,7	77,3	33,8	31,9
45,0	55,3	36,0	25,9
50,7	44,3	41,9	61,8
34,5	32,5	41,2	41,4
86,2	36,0	30,0	49,5
39,1	42,1	38,6	62,1
36,1	53,2	32,9	56,4
48,0	32,3	36,1	33,3
38,2	46,4	30,7	46,8
46,2	49,9	37,5	31,9
42,9	41,0	37,5	44,9
61,4	44,4	38,5	33,3
37,5	46,6	50,0	36,2
56,8	56,7	49,8	36,3
54,0	49,1	42,0	30,5
24,8	47,5	43,8	41,0
52,1	93,5	59,0	57,5
MEDIA \pm DS	MEDIA \pm DS	MEDIA \pm DS	MEDIA \pm DS
49,0 \pm14	51,3 \pm15	39,9 \pm7	39,3 \pm 14

In Figura 36 è riportato il profilo cromatografico caratteristico evidenziato per i campioni di pazienti affetti da MCI. In Figura 37, in Figura 38 e Figura 39 sono riportati invece i due profili (A e B) caratteristici individuati per i cromatogrammi relativi rispettivamente ai controlli, ai campioni dei pazienti con VD e ai campioni di pazienti affetti da LOAD.

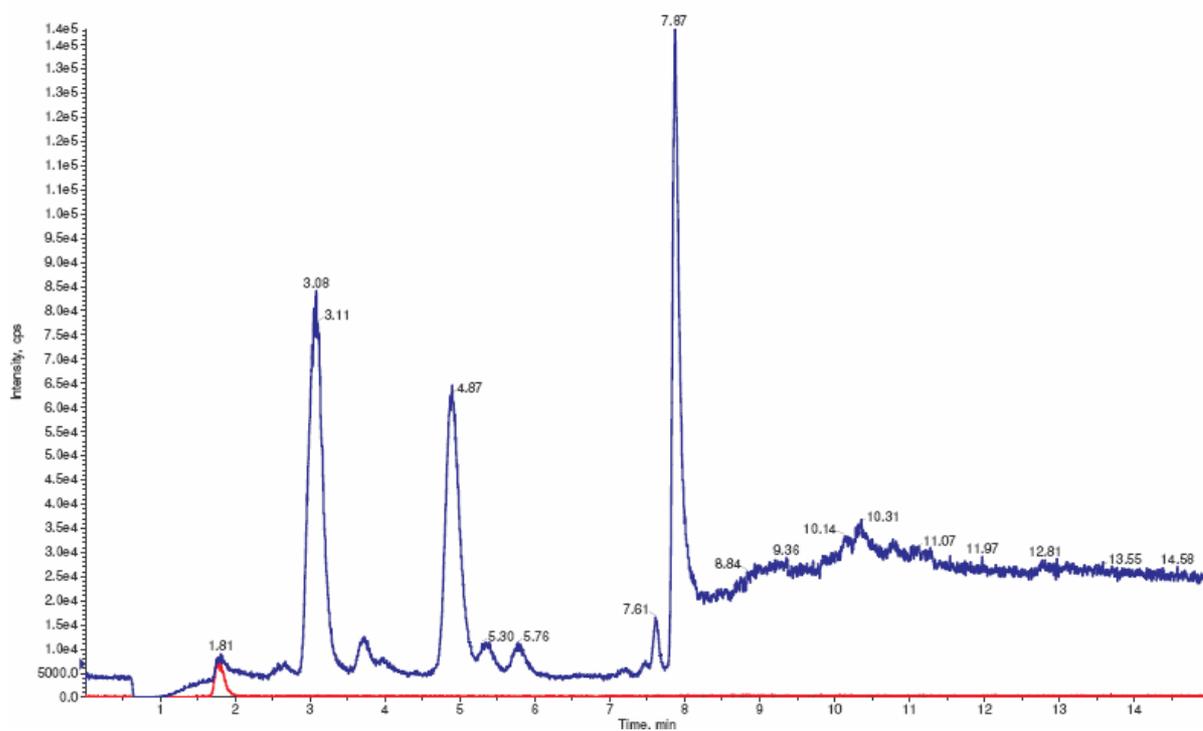


Figura 36. Profilo cromatografico caratteristico dei campioni MCI.

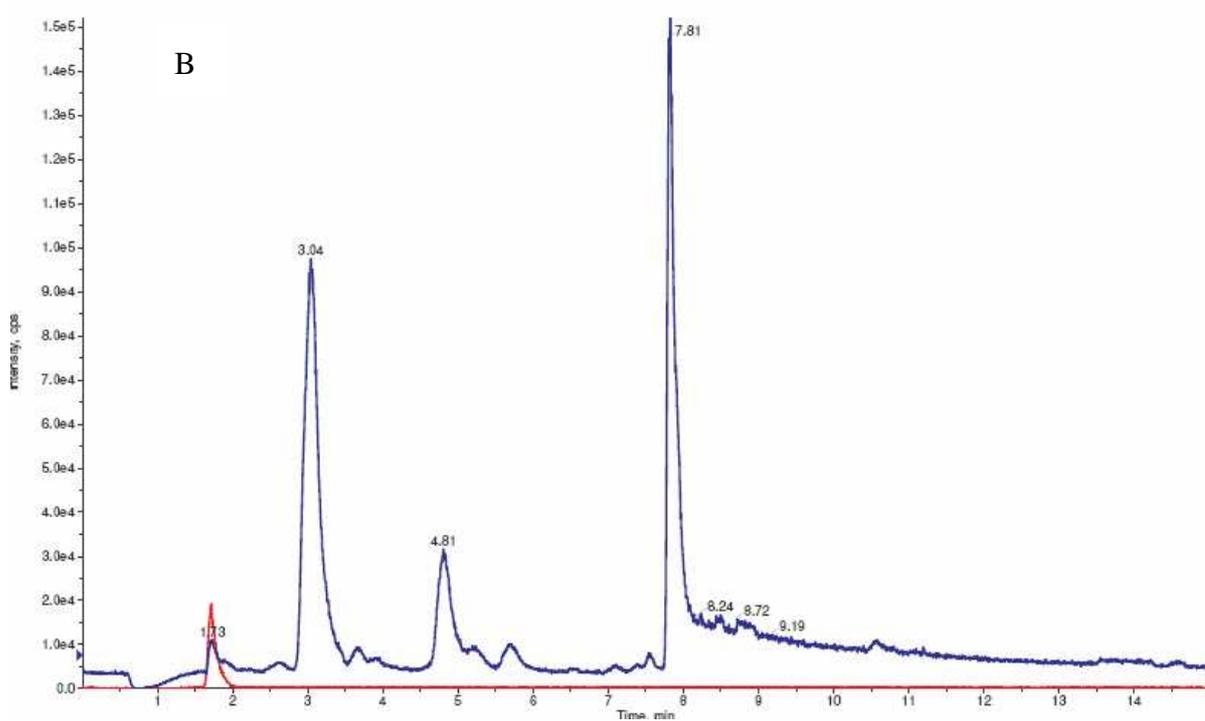
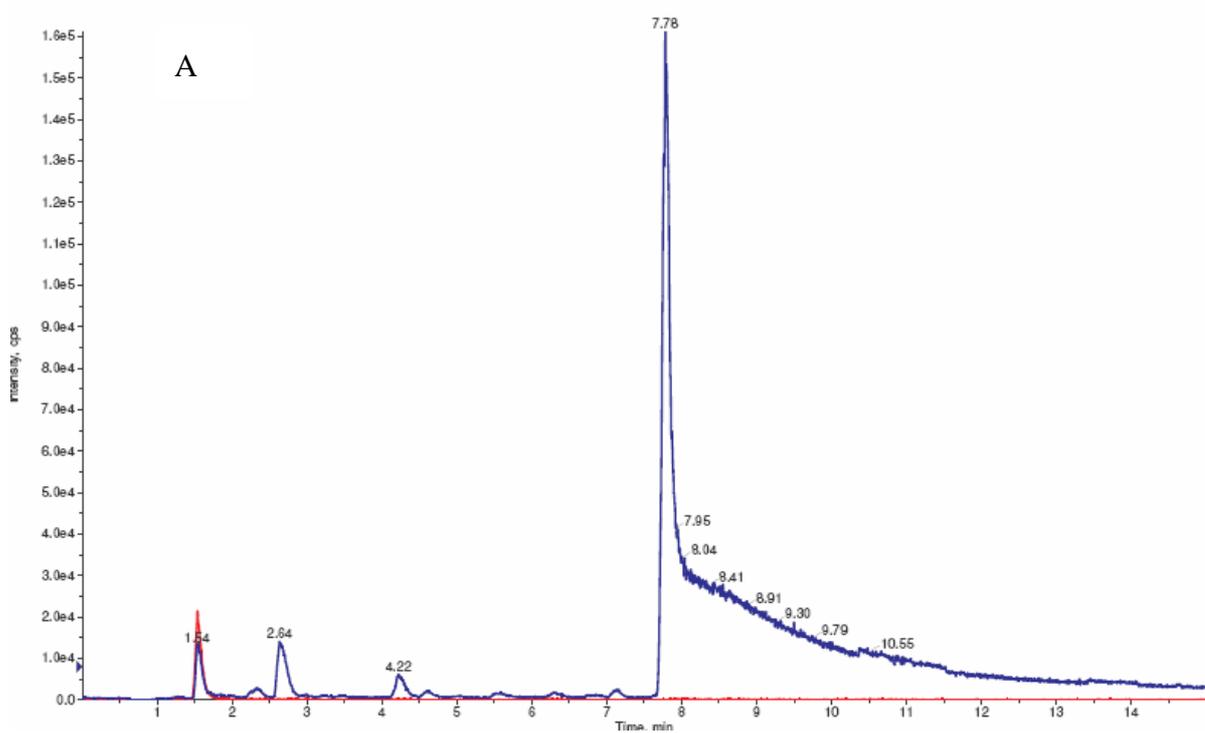


Figura 37. Profili cromatografici caratteristici (A e B) dei campioni controllo.

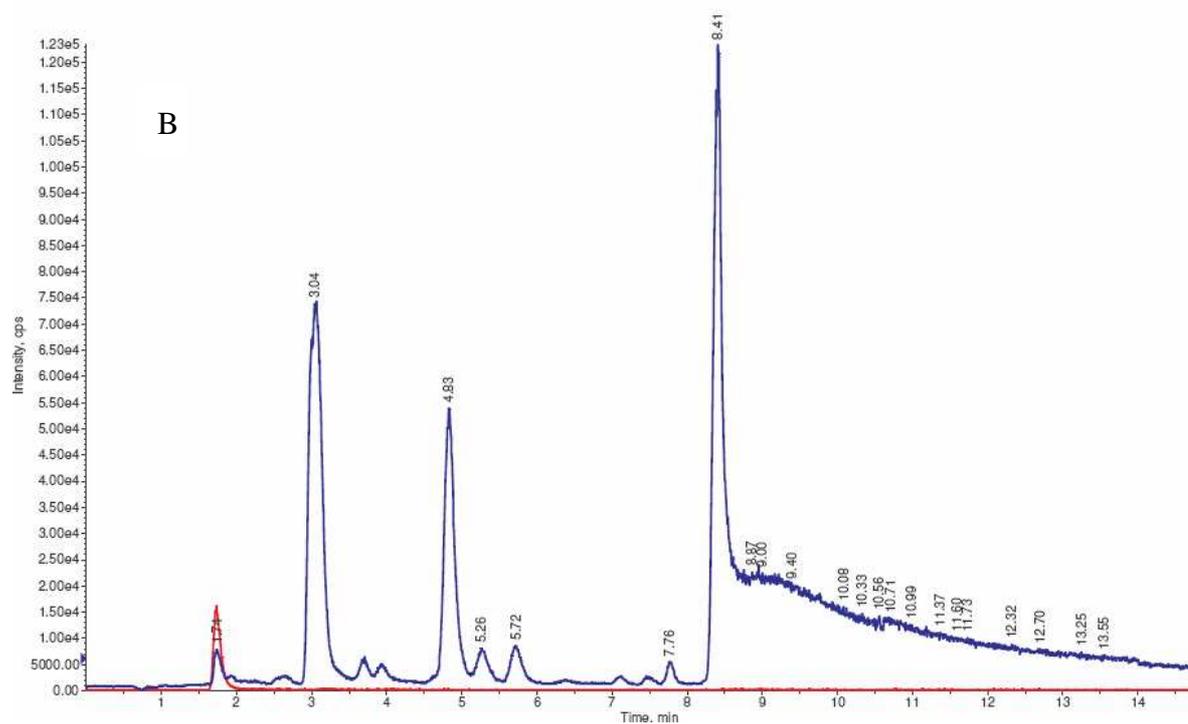
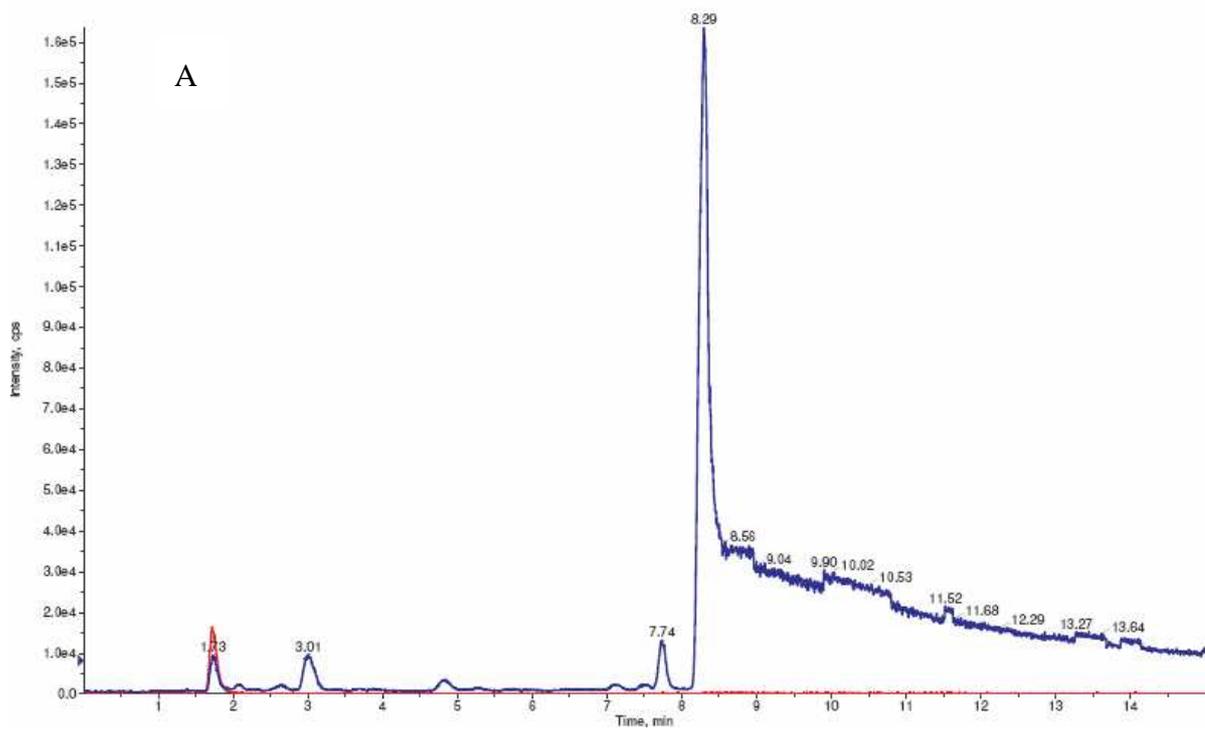


Figura 38. Profili cromatografici caratteristici (A e B) dei campioni VD.

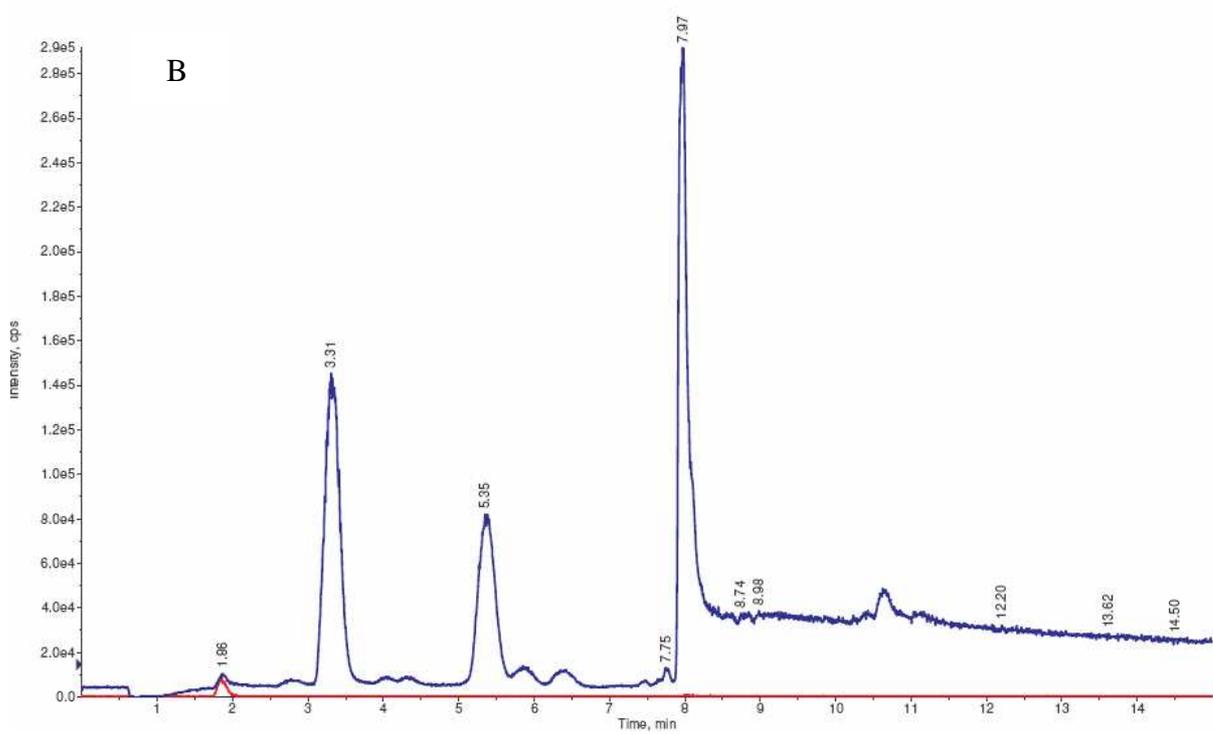
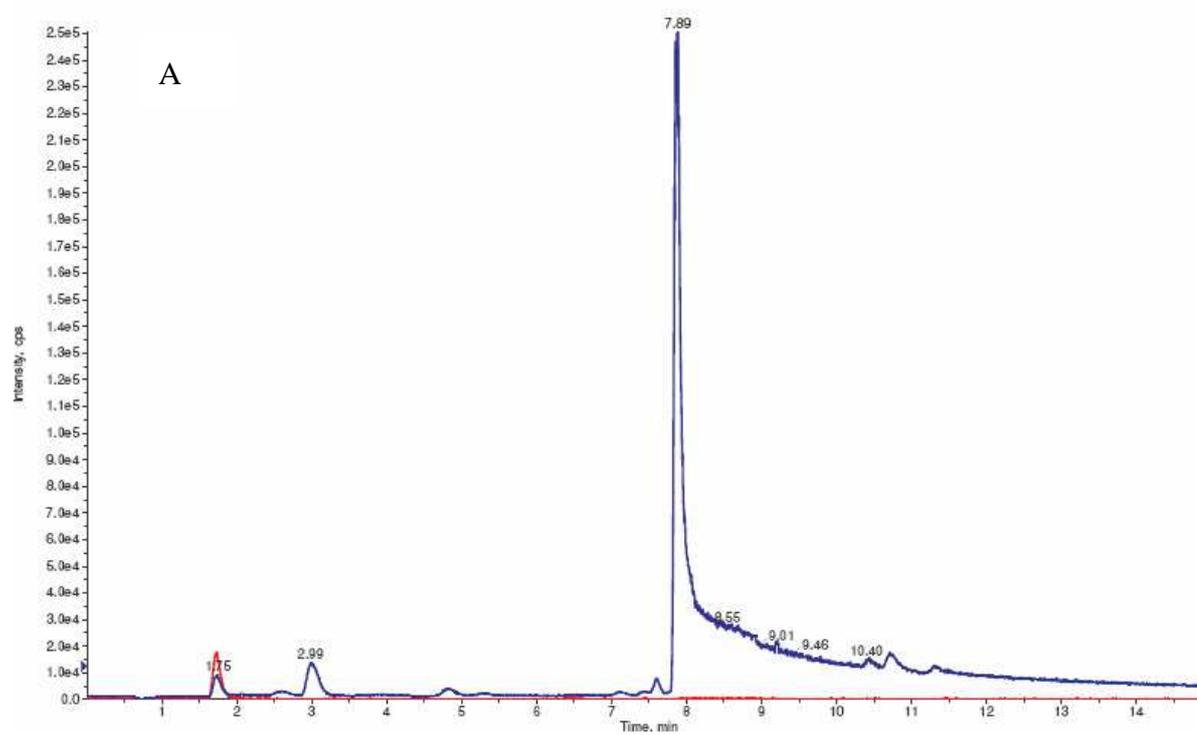


Figura 39. Profili cromatografici caratteristici (A e B) dei campioni LOAD.

3.3 *Discussione*

Studi riportati in letteratura mostrano risultati discordanti circa la correlazione tra i livelli di 24S-idrossicolesterolo e le patologie dementigene. In particolare, studi condotti su pazienti con demenza tipo Alzheimer o demenza vascolare hanno evidenziato sia un aumento che una riduzione dei livelli plasmatici o sierici di 24S-idrossicolesterolo rispetto ai controlli. Alcuni autori hanno sottolineato la possibilità di correlare tali andamenti con lo stadio della malattia, individuando un aumento della concentrazione di 24S-idrossicolesterolo nelle fasi iniziali della malattia e una diminuzione nella fase conclamata rispetto ai controlli.

Nel nostro studio, poiché i livelli di 24S-idrossicolesterolo sono risultati significativamente correlati con i livelli di colesterolemia ($r:0.40$, $p<0.002$), come precedentemente riportato in letteratura, è stato calcolato il rapporto tra 24S-idrossicolesterolo/colesterolo totale (CT) in modo da normalizzare i valori di 24S-idrossicolesterolo. Il rapporto 24S-idrossicolesterolo/CT è risultato pari a 0.22 nei controlli, 0.20 nei pazienti con VD e 0.18 nei pazienti con LOAD (ANOVA: LOAD vs C $p<0.01$).

Il rapporto 24S-idrossicolesterolo/CT è risultato correlato significativamente con:

- punteggio ottenuto al **MMSE**: $r:0.31$, $p<0.01$: i valori tendono a ridursi con il peggiorare della funzione cognitiva nel campione intero. Tale correlazione si mantiene dopo aggiustamento per sesso ed età. Lo stesso trend è presente inoltre nei pazienti con LOAD e VD, mentre è assente nei controlli, in cui però i valori di MMSE sono compresi in un range molto ristretto di valori.
- Punteggio ottenuto al **Test di Rey delle 15 parole**, che misura la memoria semantica a breve termine ($r:0.33$, $p<0.02$) e a lungo termine ($r:0.29$; $p<0.04$) : I valori tendono a ridursi al peggiorare della memoria.
- **Fluenza verbale per lettera**: test che valuta le funzioni frontali ($r:0.31$, $p<0.03$). I valori tendono a ridursi con la riduzione della produzione verbale.
- Punteggio ottenuto nella **Scala Lawton-Brody** che valuta l'autonomia del soggetto nelle attività strumentali del vivere quotidiano (IADL): $r:0.35$, $p<0.02$. A una minore autonomia funzionale corrispondono minori valori di 24S-idrossicolesterolo /CT.

I risultati ottenuti, seppur preliminari, suggeriscono che:

1. nei pazienti anziani affetti da demenza tipo Alzheimer (LOAD), i valori sierici medi di 24S-idrossicolesterolo sono ridotti rispetto ai controlli; lo stesso trend è stato osservato per i soggetti affetti da VD (Figura 40).

2. Nei pazienti affetti da MCI il valore medio di 24S-idrossicolesterolo è risultato leggermente superiore rispetto ai controlli. Ciò fa pensare ad una concordanza con quanto riportato in letteratura circa l'aumento di 24S-idrossicolesterolo nelle fasi iniziali delle patologie demenziali (Figura 40).

3. I livelli sierici di 24S-idrossicolesterolo correlano positivamente con i punteggi ottenuti in alcuni test neuropsicologici e con lo stato funzionale dei soggetti. In altri termini, il peggiorare della performance cognitiva e funzionale si associa a una parallela riduzione dei valori di 24S-idrossicolesterolo.

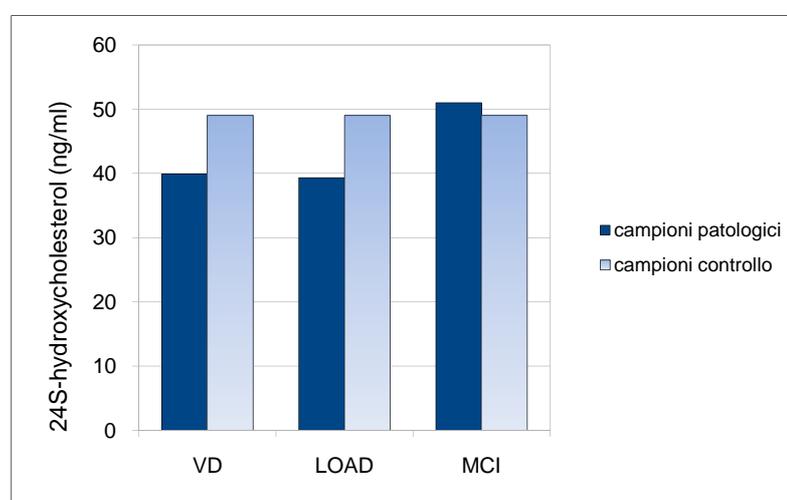


Figura 40. Confronto dei valori medi di 24S-idrossicolesterolo tra i controlli e i campioni patologici.

Come già rilevato in altri studi riportati in letteratura, restano alcuni problemi al fine di poter considerare il 24S-idrossicolesterolo un marker precoce per demenza vascolare e malattia di Alzheimer: la differenza tra i due gruppi diversi di demenza VD e LOAD (figura 40) non è risultata statisticamente significativa probabilmente a causa dell'ampia variabilità evidenziata all'interno di uno stesso gruppo (Tabella 11) e del numero di campioni. Si attende dunque di ampliare il lavoro con ulteriori studi ed aumentare il numero dei campioni da includere nella statistica.

Inoltre, oggetto di ulteriori studi sarà l'identificazione degli altri picchi presenti nei cromatogrammi, sia dei controlli che dei campioni patologici, al fine di individuare una eventuale correlazione tra la concentrazione di 24S-idrossicolesterolo e quella di altre sostanze, nonché tra i loro rapporti e lo stadio della demenza individuato dai test neuropsicologici.

4. Bibliografia

1. Alexopoulos P, Grimmer T, Perneczky R, Domes G, Kurz A. Progression to Dementia in Clinical Subtypes of Mild Cognitive Impairment. *Dement Geriatr. Cogn. Disord.* 2006 May 4; 22(1): 27-34.
2. Bianchetti A. et al. "Le demenze: WHO mental Health bulletin" Editoriale Fernando Folini 1999.
3. Bianchetti A., Metitieri T. Demenza vascolare: epidemiologia, criteri diagnostici e caratteristiche cliniche. *DEMENTIA UPDATE – NUMERO 4, APRILE 1999.*
4. BjoÈrkhem I. et al. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological disease. *Neuroscience Letters* 2000; 293: 87-90.
5. Bruins A.P., Covery T.R., H.D. Hemion. *Anal. Chem* 1986 (58): 1451.
6. Caltagirone C, Perri R, Musicco M & Gruppo di Studio "La diagnosi precoce della Malattia di Alzheimer" dell'I.T.I.N.A.D. La fase preclinica della Malattia di Alzheimer. Linee guida per il riconoscimento e lo studio dei pazienti con Mild Cognitive Impairment. *Nuova rivista di Neurologia* 2002; 12 (5): 125-132.
7. Corder EH, et al. Gene dose of ApolipoproteinE type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923, 1993.
8. Correia SC, Santos RX, Cardoso S, Carvalho C, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Effects of Estrogen in the Brain: Is it a Neuroprotective Agent in Alzheimer's Disease? *Curr Aging Sci.* 2010 Feb 18.
9. DeBarber A.E., Lutjohann D., Merkens L., Steiner R.D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of plasma 24S-hydroxycholesterol with chromatographic separation of 25-hydroxycholesterol. *Anal Biochem.* 2008 Oct 1;381(1):151-3.
10. Dole M., Mack L. L., Hines R. L., Mobley R. C., Ferguson L. D., Alice M. B. "Molecular beams of macroions". *Journal of Chemical Physics* 1968 49 (5): 2240–2249.

11. Erkinjuntti T., Gauthier S. The concept of vascular cognitive impairment. *Front Neurol Neurosci.* 2009; 24:79-85.
12. Ferri CP et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, 2005; 366; 9503 : 2112 – 2117.
13. Frears E, Stephens D, Walters C, Davies H, Austen B. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* 1999; 10: 1699–1705.
14. Gang Yu et al. Nicastrin modulates presenilin mediated notch/glp-1signal transduction and bAPP processing. *Nature* 2000;407;48.
15. Golde T.E. Alzheimer disease therapy : can the amyloid cascade be halted ? *JCI* 2003; 111:11-18.
16. Haass C. e De Strooper B. The presenilins in Alzheimer's Disease-Proteolysis Holds the Key. *Science* 1999; 286: 916-919.
17. Hoenicke J. Genes in Alzheimer's disease *Rev Neurol.* 2006 Mar 1-15;42(5):302-5.
18. Hofman A. et al. Atherosclerosis, appolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the rotterdam study. *Lancet* 1997; 349: 151-154.
19. Howard KL, Filley CM. Advances in genetic testing for Alzheimer's disease *Rev Neurol. Dis.* 2009 Winter;6 (1):26-32.
20. Irizarry MC. Biomarkers of Alzheimer Disease in Plasma. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc.* 2004; 1: 226–234.
21. Janssen JC, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Fox NC, Harvey RJ, Houlden H, Rossor MN, Collinge J. Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. *Neurology.* 2003 Jan 28;60(2):235-9.
22. Kivipelto M et al. Midle life vascular risk factors and late-life middle cognitive impairment. A population based study. *Neurology* 2001; 56: 1683-1689.
23. Kivipelto M, Helkala EL, Hanninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology.* 2001 Jun

26;56(12):1683-1689.

24. Kojro E, Gimpl G, Lammich S, März W, Fahrenholz F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effects on the α -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5815–5820.
25. Kölsch H., Heuna R., Kerksieck A., Bergmann K, Maiera A., Lütjohann D. Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients. *Neuroscience Letters* 2004; 368 :303–308.
26. Larrieu S, Letenneur L, Orgogozo JM, Fabrigoule C, Amieva H, Le Carret N, Barberger-Gateau P, Dartigues JF. Incidence and outcome of mild cognitive impairment in a population-based prospective cohort. *Neurology*. 2002 Nov 26;59 (10):1594-9.
27. Launer L.J. et al. Cholesterol and neuropathologic markers of AD. *Neurology* 2001; 57: 1447-1552.
28. Linee guida per la diagnosi e la valutazione del paziente affetto da demenza- Regione Emilia Romagna. Ottobre 2000.
29. Leoni V. Oxsterol as marker of neurological disease- a review. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 2009; 69-1:22-25.
30. Lütjohann D. et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *Journal of Lipid Research* 2000; 41: 195-198.
31. López-Arrieta JM, Rodríguez JL, Sanz F. Nicotine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD001749.
32. Lustbader JW et al. AβAD directly links Aβeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 2004 Apr 16;304(5669):448-52.
33. Masur DM, Sliwinski M, Lipton RB, Blau AD, Crystal HA. Neuropsychological prediction of dementia and the absence of dementia in healthy elderly persons. *Neurology*. 1994 Aug; 44(8): 1427-1432.

34. Milne A, Culverwell A, Guss R, Tuppen J, Whelton R. Screening for dementia in primary care: a review of the use, efficacy and quality of measures. *Int Psychogeriatr*. 2008 Oct;20(5):911-26.
35. Mouton PR, Martin LJ, Calhoun ME, Dal Forno G, Price DL. Cognitive decline strongly correlates with cortical atrophy in Alzheimer's dementia. *Neurobiol Aging*. 1998 Sep-Oct;19(5):371-7.
36. Notkola I. et al. Serum cholesterol, apolipoprotein E4, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 1998; 17: 14-20.
37. Origlia N., Arancio O., Yan S., Domenici L. Neuronal and microglial RAGE-dependent signal pathways involved in A β -induced synaptic dysfunction in entorhinal cortex. *Alzheimer's and Dementia* Volume 5, Issue 4, Supplement 1, July 2009, 498.
38. Panza F. et al. Imaging e demenza: ruolo nella diagnostica di routine. *Dementia Update* n°12 Giugno.
39. Papassotiropoulos A. et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2000 Vol 11 No 9.
40. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Kokmen E, Tangalos EG. Aging, memory, and mild cognitive impairment. *Int. Psychogeriatr*. 1997; 9 Suppl 1:65-69.
41. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild Cognitive Impairment: clinical characterisation and outcome. *Arch Neurol*. 1999 Mar; 56(3): 303-308.
42. Petersen RC, Stevens JC, Ganguli M, Tangalos EG, Cummings JL, DeKosky ST. Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2001 May 8;56(9):1133-1142.
43. Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med*. 2004 Sep; 256(3): 183-94.
44. Petersen RC. Normal aging, mild cognitive impairment, and early Alzheimer's

- disease. *Neurologist* 1995; 1:326-344.
45. Phiel C.J. et al. GSK-3a regulates production of Alzheimer's disease amyloid - β peptides. *Nature* 2003; 423: 435-439.
 46. Plotz E, Kabara J, Davis M, LeRoy G, Gould RG. Studies on the synthesis of cholesterol in the brain of the human fetus. *Am J Obstet Gynecol.*1968; 101:534–538.
 47. Querfurth H.W., LaFerla FM. Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* 2010; 362: 329-344.
 48. Ritchie K, Artero S, Touchon J. Classification criteria for mild cognitive impairment: a population-based validation study. *Neurology.* 2001 Jan 9;56(1):37-42.
 49. Román GC, Sachdev P, Royall DR, Bullock RA, Orgogozo JM, López-Pousa S, Arizaga R, Wallin A. Vascular cognitive disorder: a new diagnostic category updating vascular cognitive impairment and vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2004 Nov 15;226(1-2):81-7.
 50. Román GC. Vascular dementia prevention: a risk factor analysis. *Cerebrovasc Dis.* 2005; 20 Suppl 2:91-100.
 51. Román GC. Vascular dementia. Advances in nosology, diagnosis, treatment and prevention *Panminerva Med.* 2004 Dec; 46(4):207-15.
 52. Scarmeas N, Stern Y. Cognitive reserve and lifestyle. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2003 Aug; 25 (5):625-33.
 53. Schneider P., Hampel H., Buerger K. Biological Marker Candidates of Alzheimer's Disease in Blood, Plasma, and Serum. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 15 (2009) 358–374.
 54. Sciarra T. e Felicioni I. *Manuale di psichiatria* 2009.
 55. Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer disease. *Nature* 1999; 399: A23-A30.
 56. Selnes OA, Royall RM, Grega MA, Borowicz LM Jr, Quaskey S, McKhann GM. Cognitive changes 5 years after coronary artery bypass grafting: is there evidence of

- late decline? Arch Neurol. 2001 Apr; 58(4): 598-604.
57. Simons M, De Strooper B, Multhaup G, Tienari PJ, Dotti CG, Beyreuther K. Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. J Neurosci 1996; 16: 899–908.
 58. Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 6460–6464.
 59. Simons M. et al. Cholesterol and Alzheimer's disease. Is There a link?. Neurology 2001; 57: 1089-1093.
 60. Soto C. Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease. Molecular Medicine Today 1999; 5: 343-350.
 61. Storandt M, Botwinick RJ, Danziger WL, Berg L, Hughes CP. Psychometric differentiation of mild senile dementia of the Alzheimer Type. Arch Neurol. 1984; 46:497-499.
 62. Storandt M, Hill RD. Very mild senile dementia of the Alzheimer type. II. Psychometric test performance. Arch Neurol. 1989 Apr; 46(4):383-386.
 63. Strittmatter WE, et al. Apolipoprotein E: high avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences 90: 1977-1981, 1993.
 64. Tierney MC, Snow WG, Reid DW, Zorzitto ML, Fisher RH. Psychometric differentiation of dementia. Replication and extension of the findings of Storandt and coworkers. Arch Neurol. 1987 Jul;44 (7): 720-722.
 65. Trabucchi M. Le Demenze III edizione, , giugno 2002 Lepore V., Giunco F., Tognoni G., Epidemiologia delle Demenze e Medicina Generale; Ricerca & Pratica, 3, 2001.
 66. Wang XP, Ding HL. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. Neurosci Bull. 2008 Apr;24(2):105-9.
 67. Whitehouse C.R., Dreyer RN, Yamashita, M. Fenn JB. Anal. Chem 1985 (57): 675.

68. Xu Y, Jack CR Jr, O'Brien PC, Kokmen E, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Tangalos RG, Petersen RC. Usefulness of MRI measures of entorhinal cortex versus hippocampus in AD. *Neurology* 2000 May 9;54(9):1760-7.
69. Yu G. et al. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature*. 2000 Sep 7; 407 (6800) :48-54.
70. Zaldy Sy Tan et al. Plasma Total cholesterol level as a risk factor for Alzhiemer disease. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1053-1057.
71. Zuliani G. et al, Lipoprotein profile in older patients with vascular dementia and Alzheimer's disease. *BMC Geriatrics* 2001;1:5.