



DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA IN NEUROBIOLOGIA  
XXIII CICLO  
**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**  
SEDI CONSORZIATE: UNIVERSITÀ DI CATANIA, ROMA E PAVIA  
SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DI CATANIA

---

Dott.ssa Maria Monia Cavallaro

**ANTIOSSIDANTI NUTRIZIONALI E MEDICINA MITOCONDRIALE. RUOLO  
DEI VITAGENI NELLA CHEMOPREVENZIONE.**

**NUTRITIONAL ANTIOXIDANTS AND MITTOCHONDRIAL MEDICINE:  
ROLE OF VITAGENES AND CHEMOPREVENTION.**

—————  
TESI DI DOTTORATO  
—————

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. ROBERTO AVOLA

TUTOR:

Chiar.mo Prof. VITTORIO CALABRESE

COTUTOR:

Chiar.ma Prof.ssa MARIA TERESA CAMBRIA

---

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>106</b>
<b>1 MITOCONDRI ( MITOCHONDRIAL)</b>	
- <i>Struttura e funzioni</i>	6
- <i>Structure and function</i>	109
- <i>Medicina Mitocondriale</i>	8
- <i>Mitochondria-based intervention medicine</i>	111
<b>2 EQUILIBRIO REDOX E SISTEMI DI DIFESA ANTIOSSIDANTE</b>	
<b>REDOX BALANCE AND ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEMS</b>	
- <i>Stress ossidativo</i>	10
- <i>Oxidative stress</i>	113
- <i>Specie Reattive dell'Ossigeno</i>	11
- <i>Reactive oxigene species (ROS)</i>	114
- <i>Tossicità dei ROS</i>	14
- <i>ROS Toxicity</i>	116
- <i>Meccanismi di difesa antiossidante</i>	18
- <i>Mechanism of antioxidant defence</i>	120
- <i>Meccanismi di difesa “ Heat Shock Response”</i>	25
- <i>Defence mechanism “heat shock response”</i>	127
<b>3. SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>23</b>
<b>3. AIM OF THE RESEARCH</b>	<b>144</b>
<b>4. MATERIALI E METODI</b>	<b>49</b>
<b>4.MATERIAL AND METHODS</b>	<b>148</b>
<b>5. RISULTATI</b>	<b>70</b>
<b>5. RESULTS</b>	<b>166</b>
<b>6. DISCUSSIONE</b>	<b>85</b>
<b>6. DISCUSSION.....</b>	<b>178.</b>
<b>7 FIGURE</b>	<b>199</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>251</b>

## **-INTRODUZIONE-**

La vita è interazione tra struttura ed energia, fino a pochi anni fa il ruolo della carenza di energia nelle malattie umane era poco esplorato dalla medicina moderna (1).

Dal 1960, quando Luft ha descritto la prima malattia mitocondriale, è aumentato il numero di malattie correlate ai disordini “cellulari” da identificare e studiare in base anche ad un programma di ricerca clinica. (2)

Considerato il grande incremento delle patologie metaboliche e degenerative negli ultimi 50 anni, l’interesse per il mitocondrio è notevolmente aumentato.

Questo è dovuto anche alla scoperta del ruolo importante che esso svolge in patologie di grande impatto demografico; le disfunzioni mitocondriali sono state infatti riportate in un ampio numero di patologie, non solo neurologiche, neuromuscolari e neurodegenerative (2), ma anche in patologie comuni come il diabete, i tumori e le malattie cardio-vascolari.

Se prima questo organello era quindi conosciuto e studiato principalmente dai biochimici, oggi è diventato il protagonista di molti studi di biologia molecolare, che coinvolgono patologi, demografi e genetisti. Stiamo assistendo quindi alla nascita di una vera e propria "Medicina Mitocondriale"(1). Le malattie mitocondriali, come suggerisce il nome, sono quindi una serie di disordini, sia clinici che eziologici, direttamente e indirettamente correlati alle patologie mitocondriali, che riguardano le mutazioni del DNA, la perturbazione redox mitocondriale, i difetti della produzione di energia mitocondriale. (2)

Nel 1972 Harman per primo propose che i mitocondri avessero un ruolo centrale nei processi di invecchiamento. Secondo questa teoria, i radicali liberi generati attraverso il metabolismo mitocondriale possono

fungere da fattore primario nel causare funzioni anormali e morte cellulare (3).

Numerose evidenze dati sperimentali dimostrano il coinvolgimento dello stress ossidativo nei disordini neurodegenerativi (4). L'ossidazione delle proteine e dei lipidi altera l'omeostasi redox e porta all'accumulo di proteine "unfolded o misfolded" nel cervello. Il morbo di Parkinson, la malattia di Alzheimer e l'atassia di Friedreich sono malattie neurologiche che hanno come comune denominatore la produzione di proteine anomale. La disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo contribuiscono alla patogenesi delle così dette "malattie delle proteine conformazionali." (5).

La disfunzione mitocondriale gioca un ruolo chiave nei disordini neurodegenerativi. Il danno mitocondriale è responsabile dell'alterazione dell'attività della catena respiratoria come dimostrato nel morbo di Parkinson, nella malattia di Alzheimer e nella malattia di Huntington. Difetti nell'attività del complesso respiratorio, associati alla perturbazione del bilancio ossidante/antiossidante, sono responsabili della disfunzione del metabolismo energetico e inducono la degenerazione cellulare (6).

Le mutazioni del DNA mitocondriale, sia ereditarie che acquisite, causano un mal funzionamento della catena del trasporto elettronico (ETC), provocando un aumento della formazione di radicali liberi tossici, un decremento della produzione di ATP e l'alterazione dell'omeostasi del calcio. Inoltre, la disfunzione dell'ETC provoca l'ossidazione del DNA mitocondriale, delle proteine, dei lipidi ed alterazione della permeabilità mitocondriale, un evento associato con la degenerazione e la morte cellulare (7). I mitocondri sono la principale fonte di molecole ossidanti e studi in vitro dimostrano che approssimativamente l'1-2% del flusso di elettroni attraverso l'ETC ha come conseguenza la generazione di anione superossido (3). Inoltre, varie tossine ambientali, possono danneggiare gli enzimi mitocondriali

provocando il rilascio di elevati livelli di radicali liberi che contribuiscono ad accelerare l'invecchiamento cellulare.

Durante gli ultimi anni, il bilancio redox cellulare è diventato oggetto di numerosi studi, riguardanti l'invecchiamento cerebrale ed i meccanismi di neurodegenerazione (8).

Uno dei principali sistemi redox intracellulari coinvolti nella neuroprotezione è il sistema dei vitageni, che sta emergendo come target potenziale per nuovi interventi citoprotettivi.

I vitageni codificano per la heat shock protein (Hsp) Hsp-70, l'heme ossigenasi-1, la tioredoxina reduttasi e le sirtuine. Studi nutrizionali dimostrano che l'invecchiamento negli animali può essere significativamente influenzato da una restrizione della dieta. La qualità della vita (lifespan) aumenta, poiché i vari tessuti nelle malattie possono essere protetti riducendo l'energia d'entrata, con il controllo della restrizione calorica o con il digiuno ad intermittenza. La genetica ha rivelato che l'invecchiamento può essere controllato dai cambiamenti nel rapporto intracellulare NAD/NADH, regolando il sistema delle sirtuine, un gruppo di proteine collegate all'invecchiamento, al metabolismo ed alla tolleranza allo stress in diversi organismi.

Il ruolo neuroprotettivo di antiossidanti dietetici, quali il curcumino, l'acetyl-L-carnitina e la carnosina è stato dimostrato attraverso l'attivazione di queste vie intracellulari redox-sensitive. Sebbene l'idea che le stress proteins siano neuroprotettive sia ampiamente accettata, ulteriori studi sono necessari per chiarire l'associazione tra neuroprotezione ed attivazione della "stress response" (5).

## Mitocondri

### *Struttura e Funzioni*

I mitocondri sono organelli intracellulari ovoidali o sferoidali con un diametro trasversale di 0,1-0,5  $\mu\text{m}$  e lunghezza variabile. In accordo all'ipotesi endosimbiotica, i mitocondri derivano dai procarioti, che si sono integrati nel nucleo contenuto nella cellula. Il numero dei mitocondri per cellula va da zero (negli eritrociti) a 10000 (nelle cellule del muscolo striato). Il numero medio è di 500-2000 per cellula. Il numero di mitocondri all'interno della cellula aumenta in rapporto al substrato ed all'ossigeno richiesto da un particolare tipo di cellula (9)

I mitocondri sono caratterizzati da due membrane, interna ed esterna e da due compartimenti separati dalla membrana interna. Le creste sono invaginazioni della membrana interna, continui allo spazio intermembrana, che servono ad aumentare la superficie della membrana mitocondriale interna. La matrice è circondata dai ripiegamenti della membrana interna. Dentro la matrice sono localizzati un ampio numero di enzimi, proteine e peptidi, compreso il complesso della catena respiratoria, la DNA-polimerasi, i chaperoni (heat shock protein), mRNAs, tRNAs e il DNA mitocondriale (9).

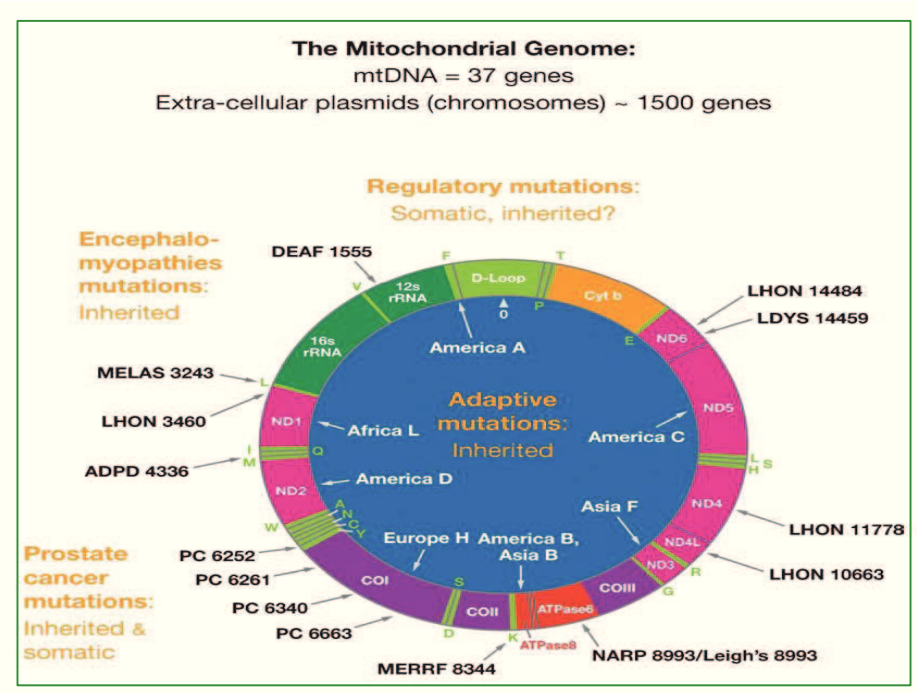
La membrana mitocondriale esterna è permeabile a piccole molecole e ioni, i quali si spostano attraverso i canali transmembrana, formati da una famiglia di proteine integrali di membrana definite porine. Le porine sono canali anionici a potenziale dipendente della membrana esterna, potenzialmente sensibili, che permettono lo scambio di metaboliti tra i mitocondri e il citoplasma. La membrana interna è impermeabile agli ioni  $\text{H}^+$  e questa proprietà sta alla base della trasduzione energetica dei mitocondri. Specie

chimiche come ioni e piccole molecole che attraversano la membrana interna hanno specifici trasportatori. La membrana interna porta, come proteine integrali, i catalizzatori chiave della fosforilazione ossidativa; gli elettroni vengono trasferiti dal complesso respiratorio al complesso dell'ATP sintasi (10)

I mitocondri sono utili per quattro ruoli biologici fondamentali: rifornimento di ATP, mediazione di morte cellulare con apoptosi, produzione di calore e contributo alla genetica umana.(11).

Ampie evidenze dimostrano che i mitocondri svolgono anche un ruolo importante nel processo di apoptosi. (9).

I mitocondri hanno un loro genoma funzionale, separato da quello nucleare (12). Il DNA mitocondriale (MtDNA) si trova all'interno della matrice ed ha caratteristiche funzionali e strutturali differenti da quello nucleare (ntDNA). Il MtDNA è circolare, con una molecola a doppio filamento (il filamento pesante H, ricco in guanine) e quello leggero (L, ricco in citosine) composto da 16569 paia di basi. Il mtDNA contiene 37 geni dei quali 24 sono necessari per la traduzione del mtDNA. I geni del MtDNA codificano per due rRNAs, 22 tRNAs e 13 polipetidi (28 sul filamento H e nove sul filamento L).



### **-Mappa di DNA mitocondriale umano.**

Differente dal DNA nucleare, quello mitocondriale ha sequenze di esoni ma non introni, il mtDNA non è intrecciato con gli istoni, non ha un efficace sistema di riparazione e utilizza un codice genetico differente. Il mtDNA dipende dal nDNA per i suoi enzimi di replicazione, trascrizione, traduzione e riparazione. Durante il loro sviluppo i mitocondri si dividono e proliferano sotto controllo del nucleo (13). Nei mammiferi tutti mitocondri sono ereditati dalla madre (14).

### ***Medicina mitocondriale***

La medicina mitocondriale, un'area relativamente emergente, si è sviluppata rapidamente con il crescente aumento della conoscenza delle malattie mitocondriali. L'intervento sui mitocondri, ha usufruito dei benefici derivati dalla conoscenza delle basi molecolari delle malattie mitocondriali.



Le strategie della nascente medicina mitocondriale possono essere divise in due categorie: 1) prevenzione delle disfunzioni mitocondriali nelle malattie con determinate eziologie correlate ai mitocondri, essenziale per il trattamento di malattie mitocondriali ereditarie come la neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON) (15); e 2) interventi sulle malattie con prevalenza di difetti mitocondriali, per esempio rare malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson (16). Le strategie della medicina mitocondriale puntano prevalentemente sull'intervento nelle patologie mitocondriali, incluse la perturbazione bioenergetica cellulare, lo stress ossidativo, le mutazioni del mtDNA, il deterioramento delle capacità di trasporto del calcio mitocondriale, l'apoptosi originata dai mitocondri e difetti nel comportamento dei mitocondri.

## **EQUILIBRIO REDOX E SISTEMI DI DIFESA ANTIOSSIDANTE**

### ***Stress ossidativo***

L'iperproduzione di radicali liberi, specie molecolari che in minima quantità si producono continuamente nel nostro organismo, costituisce una causa importante di invecchiamento cellulare e svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi di un'ampia varietà di stati patologici (17). In condizioni normali, nella cellula operano efficienti sistemi di difesa antiossidante. Quando il rate di generazione di radicali liberi eccede la capacità delle difese antiossidanti si instaura una condizione di "stress ossidativo" che rappresenta il "primum movens" per conseguenze che possono portare al danno cellulare irreversibile (18). Numerosi dati sperimentali evidenziano il coinvolgimento dello stress ossidativo nel meccanismo dell'invecchiamento e delle neurodegenerazioni (19).

Lo stress ossidativo è quindi caratterizzato da uno squilibrio dello stato redox e del bilancio ossidante/antiossidante che può portare ad un'alterata funzione cellulare ed a danno ossidativo di macromolecole biologiche fondamentali, quali proteine (carbonili proteici, nitratura di tirosina), lipidi (prodotti di perossidazione lipidica) ed acidi nucleici (20,21).

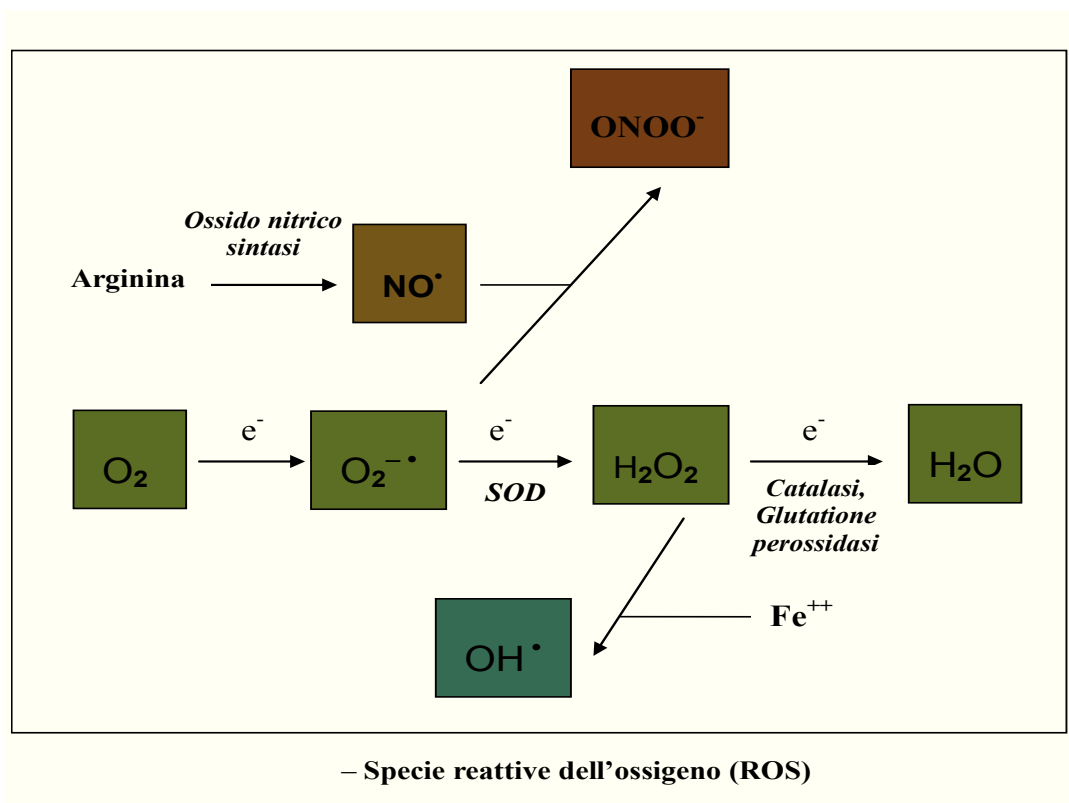
Lo stress ossidativo è indotto sia da fonti esogene che endogene (22). Le prime comprendono farmaci e sostanze chimiche tossiche che spostano l'equilibrio ossidanti/antiossidanti verso lo stato di ossidazione; le seconde comprendono invece la iperproduzione di intermedi reattivi dell'ossigeno ad opera della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale. Una delle cause

principali dello stress ossidativo è quindi l'eccessivo rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

### ***Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)***

I ROS sono definiti come entità molecolari che reagiscono con i componenti cellulari, provocando effetti nocivi sulle loro funzioni. I ROS comprendono sia radicali liberi (contenenti elettroni spaiati altamente reattivi), come l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ), l'ossido nitrico ( $NO^{\cdot}$ ) e il radicale idrossile ( $OH^{\cdot}$ ), sia altre specie molecolari, come l'acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ) ed il perossinitrito ( $ONOO^-$ ).

La maggior parte dei ROS cellulari sono generati durante l'incompleta riduzione metabolica dell'ossigeno ad acqua (vedi figura sottostante).



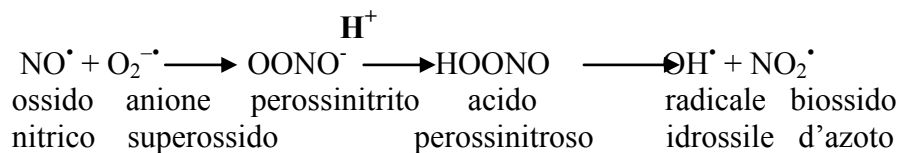
La molecola dell'ossigeno rappresenta un paradosso biologico per cui da un lato è una molecola indispensabile per la vita aerobica, dall'altro un azzardo biologico dovuto alla sua notevole tossicità. Infatti, l'ossigeno, che

viene assunto dall'ambiente esterno attraverso la respirazione, viene richiesto nella respirazione mitocondriale per la produzione di energia sotto forma di ATP secondo un complesso processo che prende il nome di “fosforilazione ossidativa”; l'ossigeno, fungendo da accettore finale degli elettroni sottratti alle molecole e combinandosi con i protoni sottratti alle stesse, permette la completa ossidazione in acqua ed anidride carbonica di molecole di varia natura (glicidi, acidi grassi, aminoacidi, etc.), con liberazione di tutta l'energia in esse contenuta.

Al tempo stesso, una quota pari al 2-4% dell'ossigeno consumato dall'intero organismo viene convertita in specie molecolari, che sono definite radicali liberi, cioè molecole, altamente reattive, dotate di un elettrone spaiato, che sottraggono alle molecole con cui vengono a contatto l'elettrone di cui necessitano per ripristinare la normale situazione dell'orbitale a numero pari di elettroni (23).

L'attivazione dell'ossigeno molecolare può generalmente avvenire attraverso due vie: una mediante elettroni ed una mediante energia (17). I radicali liberi che si possono formare durante la riduzione sequenziale monoelettronica dell' $O_2$  sono: l'anione superossido ( $O_2^-$ ), il perossido d'idrogeno (HOOH) radicale idrossile ( $OH^*$ ). Nella via di attivazione energetica, bastano 22 kcal di energia perché si abbiano transizioni elettroniche a livello dell'orbitale molecolare dell'ossigeno che portano alla formazione dell'ossigeno singoletto ( $O_2$ ) che non è un radicale, in quanto non vi è un elettrone spaiato, ma è dotato di una forte capacità ossidante, e, per degradazione, genera anione superossido ( $O_2^-$ ). Le radiazioni ionizzanti, sostanze fotosensibilizzanti, il calore, la morte di una cellula, sono tutti fenomeni entropici termodinamicamente favorevoli alla liberazione di quantità di energia anche superiori a questa soglia e, pertanto, sufficienti perché queste transizioni elettroniche abbiano luogo (23). Anche l'eccessiva produzione del NO, una molecola fisiologicamente importante per la regolazione del tono

vasale e dei processi immunomodulatori, può generare forme radicaliche se associata ad una concomitante sovrapproduzione di anione superossido (24). L'endotelio sembra produrre continuamente piccole quantità di superossido in grado di reagire con l'ossido nitrico (entrambi radicali liberi) a formare ioni nitrato, un prodotto non radicalico. Per questo motivo variazioni nella produzione di ossido nitrico e di superossido da parte dell'endotelio possono rappresentare un meccanismo di regolazione del tono vasale. L'anione perossinitrito, degradando, forma il radicale idrossile (24,25).



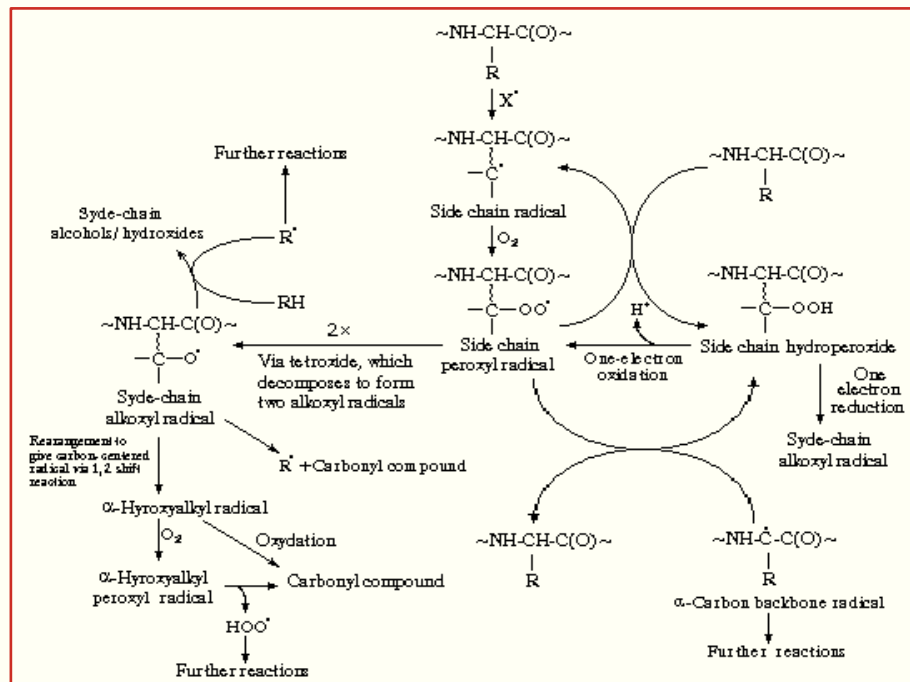
Se due radicali liberi reagiscono fra di loro, si eliminano a vicenda; quando una specie radicalica reagisce con una molecola non radicalica, si produce un nuovo radicale libero e si innesca una catena di reazioni fino a che non si forma un composto stabile. Si passa quindi dalla fase di “generazione” a quella della “propagazione” del radicale libero (23).

La formazione di specie radicaliche dell'ossigeno è quindi una evenienza non eliminabile nell'ambiente cellulare.

### ***Tossicità dei ROS***

Certe situazioni cliniche o l'intensificarsi di fattori esterni quali l'inquinamento ambientale, il fumo, l'alimentazione ricca di grassi, l'abuso di alcolici, le radiazioni solari, l'uso di determinati farmaci, lo stress psicofisico, sono tutte condizioni generalmente associate a sovrapproduzione di radicali liberi. Quando la generazione di radicali liberi eccede la capacità detossificante delle difese antiossidanti, si instaura una condizione di "stress ossidativo". Questa rappresenta un rischio per l'integrità strutturale e funzionale di molecole importanti come DNA, proteine e lipidi (22). I radicali liberi ed in particolare l' $\text{OH}\cdot$ , che è il radicale libero più reattivo, può reagire con svariate molecole, modificandole drasticamente sul piano chimico ed alterandone profondamente la funzione.

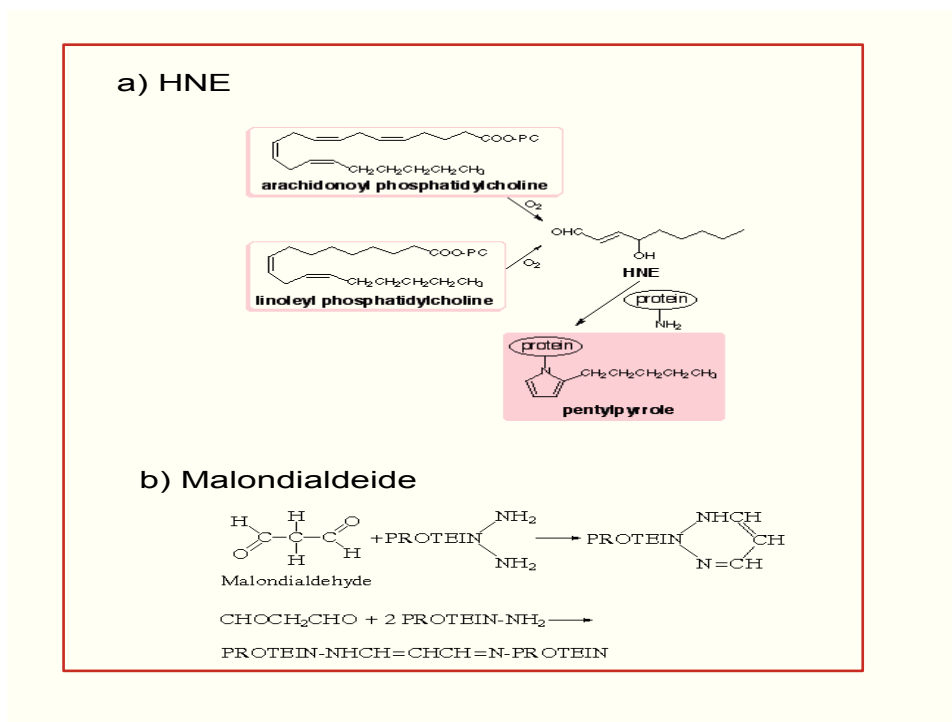
Le proteine possono essere ossidate a livello dei gruppi sulfidrilici attraverso un processo che comporta la disattivazione di proteine canale, recettoriali o dotate di importanti attività enzimatiche (26,27); ad esempio enzimi come la fosfofruttochinasi, il complesso I ed il complesso IV della catena respiratoria mitocondriale vengono inattivati con grave deterioramento delle capacità di approvvigionamento energetico della cellula, la pompa del calcio viene inattivata con conseguente tendenza al mantenimento di elevati livelli di calcio citosolubile.



### **-Ossidazione diretta delle catene laterali di residui amminoacidici con formazione di carbonili**

Gli acidi nucleici sono sensibili all'attacco radicalico a livello sia delle basi che dei pentosi con conseguente rottura delle eliche con formazione di basi modificate come l'8-idrossi-guanina ed alterazione del codice genetico (23).

L'effetto dannoso più conosciuto dell'azione dei ROS è la perossidazione lipidica, una reazione a catena che porta alla formazione di perossidi lipidici e idroperossidi a partire dall'ossidazione di un ponte metilenico a livello di un acido grasso polinsaturo dei lipidi di membrana, come l'acido arachidonico e l'acido linolenico. I lipidroperossidi tendono a spostarsi dall'interno idrofobico della membrana verso la sua superficie, portando ad una disorganizzazione della struttura della membrana stessa. Ne derivano quindi danni irreversibili all'assetto morfofunzionale delle membrane cellulari ed intracellulari o delle lipoproteine (28).



### -Formazione di addotti fra le proteine e prodotti della perossidazione lipidica.

Il danno ossidativo protratto a carico di molecole importanti come DNA, proteine e lipidi, elicitato dalle specie attivate di ossigeno e dell'NO, è ritenuto, alla luce delle più attuali evidenze sperimentali e cliniche, la causa più importante delle modificazioni biochimiche e fisiopatogenetiche che si osservano durante l'invecchiamento del SNC, compresi i disordini neurodegenerativi (24).

Numerose evidenze sostengono il coinvolgimento dello stress ossidativo quale fattore primario nella patogenesi dell'invecchiamento e delle neurodegenerazioni: a) la quantità di molecole di DNA e proteine alterate ossidativamente dai radicali liberi aumenta progressivamente con l'età, unitamente al progressivo aumento sia di anione superossido che di acqua ossigenata di origine mitocondriale, ed alla suscettibilità ad eventi stressanti esogeni; b) regimi alimentari che estendono il life-span, come la restrizione calorica in assenza o in presenza di assunzione di vitamina E nei mammiferi,



e la riduzione del consumo di ossigeno negli insetti, riducono significativamente l'accumulo dei markers del danno ossidativo a carico di DNA e proteine associati al progredire del ciclo vitale; c) i mitocondri contribuiscono in modo controverso alla sopravvivenza cellulare in virtù della loro classica funzione di centrale energetica ed al tempo stesso di sorgente di radicali liberi costituenti la maggior causa di invecchiamento cellulare. Questa ambivalenza conflittuale rappresenta la natura dualistica di una stessa funzione: la respirazione cellulare.

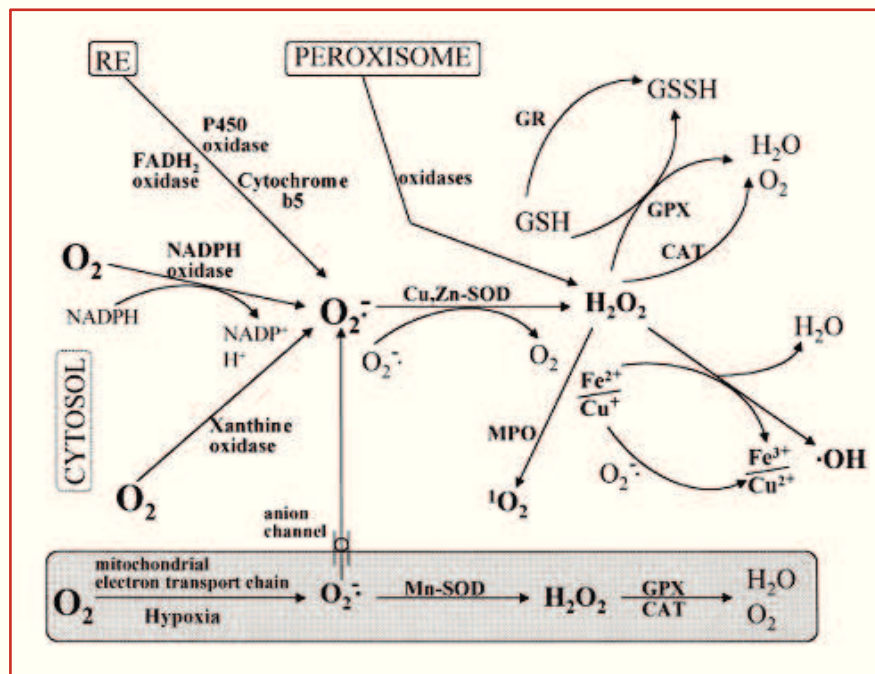
L'alterazione dell'equilibrio redox e la disfunzione mitocondriale che ne consegue, è coinvolta quindi nella neuropatogenesi di molti stati patologici compresi i disordini neurodegenerativi quali la sclerosi multipla (MS), la malattia di Parkinson (PD), la malattia di Alzheimer (AD), ed anche l'invecchiamento (29). Il cervello ha una grande potenzialità ossidativa (30) dovuta agli alti livelli di consumo di ossigeno, tuttavia la capacità del cervello nel contrastare lo stress ossidativo è limitata per le seguenti ragioni fisiologiche e biochimiche: a) elevato contenuto di substrati facilmente ossidabili come gli acidi grassi polinsaturi e le catecolammine; b) bassi livelli di specie chimiche antiossidanti come il glutatione, la vitamina E e di enzimi antiossidanti (glutazione perossidasi, catalasi e SOD); c) formazione endogena di specie radicaliche dell'ossigeno attraverso reazioni specifiche; d) alto contenuto di ferro in specifiche regioni del cervello umano come il globus pallidus e la substantia nigra. Il liquido cefalorachidiano ha una capacità di legare il ferro molto bassa per il suo basso contenuto di transferrina; e) il SNC contiene cellule che non si replicano più come i neuroni i quali, una volta danneggiati possono perdere definitivamente la loro funzionalità oppure andare incontro ad apoptosi. Numerose evidenze sperimentali portano alla conclusione che la disfunzione a livello del metabolismo energetico cellulare è un importante fattore della neurotossicità mediata dall'NO e che il

contenuto cellulare dei tioli è cruciale nel determinare la sensibilità delle cellule allo stress ossidativo e nitrosativo (31).

### *Meccanismi di difesa antiossidante*

In condizioni normali, nella cellula, c'è un equilibrio tra proossidanti ed antiossidanti necessario per il mantenimento di un ottimale efficienza dei sistemi di difesa antiossidante che, durante il normale metabolismo cellulare, possono adeguatamente far fronte a tutti i radicali liberi generatisi (7).

Inoltre, recenti studi dimostrano che una minima quantità di radicali liberi, che fino ad oggi sono stati considerati solo causa di invecchiamento, è condizione necessaria per un'ottima funzionalità delle cellule, poiché porta ad una maggiore efficienza dei sistemi di difesa e ad una maggiore sopravvivenza cellulare (31).



**-Produzione intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e meccanismi di difesa.** Nel reticolo endoplasmatico la citocromo P-450 ossidasi può rilasciare elettroni all'O<sub>2</sub> e formare O<sub>2</sub><sup>•-</sup>; la FADH<sub>2</sub> ossidasi ed il

citocromo b<sub>5</sub> possono prendere parte a questo sistema. L'anione superossido può essere degradato dalla Mn-SOD mitocondriale o dalla Cu/Zn-SOD citosolica a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. All'interno dei perossisomi sono presenti sistemi enzimatici che producono H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, senza utilizzare l'anione superossido come intermedio. La H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a differenza dell' O<sub>2</sub><sup>-</sup> può attraversare la membrana cellulare e reagire facilmente con Fe<sup>+2</sup> e Cu<sup>+</sup> per formare <sup>•</sup>OH. GR= glutazione riduttasi; MPO = mieloperossidasi; RE = reticolo endoplasmatico; <sup>1</sup>O<sub>2</sub> = ossigeno singoletto.

Nella cellula, sul fronte dell'insulto ossidativo, a livello del citoplasma, nei mitocondri ed anche nel liquido extracellulare, esistono efficienti meccanismi di difesa antiossidante di natura enzimatica e non enzimatica. Nel primo caso si tratta di enzimi citoprotettivi (superossido dismutasi, catalasi, glutazione perossidasi), detti "scavengers", cioè che funzionano come "spazzini" nei confronti dei radicali liberi, tendendo a rimuoverli non appena formati o ad impedirne la formazione. Nel secondo caso si tratta di sostanze antiossidanti in grado di reagire con i radicali liberi, sequestrandoli o neutralizzandoli, e pertanto capaci di bloccare la serie delle reazioni di perossidazione dei lipidi, quindi di impedire sia l'azione lesiva che la propagazione dei radicali liberi; tra queste si annoverano: molecole in grado di legare l'O<sub>2</sub> singoletto (β-caroteni, retinoidi); inibitori della xantina ossidasi (allopurinolo); molecole a basso peso molecolare, sia idrosolubili: quali l'acido ascorbico (vitamina C) e il glutazione, che operano nel plasma sanguigno e nel citosol, sia liposolubili: quali l'α-tocoferolo (vitamina E), la bilirubina, l'acido urico, gli estrogeni, che invece esercitano la loro azione nel cuore idrofobico delle membrane cellulari o delle lipoproteine plasmatiche (23).

Negli ultimi anni, da quando lo stress ossidativo è stato ritenuto alla base di alcuni, se non di tutti, gli aspetti della neurodegenerazione, sono state

condotte numerose ricerche sperimentali allo scopo di ridurre gli effetti dello stress ossidativo attraverso l'utilizzo degli scavengers dei radicali liberi. Alcuni composti nutrizionali sono stati identificati tra questi. Vi sono due classi generali di antiossidanti, endogeni ed esogeni. Tra i primi vi sono il tripeptide glutatione (GSH), diverse vitamine e prodotti di reazioni catalizzate da enzimi che vengono sottoposti ad upregulation in risposta allo stress ossidativo, come la bilirubina dall'emeossigenasi, e prodotti dell'ARE (antioxidant responsive element) (32). Tra i secondi, gli antiossidanti nutrizionali, vi sono diverse classi di molecole: quelle che aumentano i livelli endogeni di GSH o che diversamente hanno funzionalità reattive -SH; vitamine; composti fenolici e polifenolici (33,34). Il tripeptide glutatione ( $\gamma$ -glutamyl-cisteinil-glicina) è un antiossidante endogeno di grande importanza. Il glutatione (GSH) è richiesto per il mantenimento dello stato redox tiolico della cellula, per la protezione dal danno ossidativo, per la detossificazione di elettrofilo e metalli reattivi endogeni ed esogeni, per il deposito ed il trasporto della cisteina, come pure per la sintesi delle proteine e del DNA, per la regolazione del ciclo cellulare, e per la differenziazione cellulare (35). Il glutatione e gli enzimi glutatione-dipendenti svolgono un ruolo chiave nel proteggere la cellula dagli effetti delle specie reattive dell'ossigeno. L'elemento chiave funzionale del glutatione è la parte cisteinica, che fornisce il gruppo reattivo tiolico. Il glutatione costituisce la difesa predominante dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), le quali vengono ridotte dal glutatione in presenza della glutatione perossidasi. Come conseguenza il GSH viene ossidato a GSSG, che, a sua volta, viene rapidamente ridotto di nuovo a GSH dalla glutatione riduttasi a spese del NADPH. Il ciclo redox tiolo-disulfide contribuisce, altresì, a mantenere ridotti i tioli proteici ed enzimatici. In assenza di un processo di riduzione dei disolfidi proteici, i residui vulnerabili di cisteina degli enzimi essenziali potrebbero rimanere ossidati, con conseguente alterazione dell'attività catalitica. Il glutatione contribuisce,

altresì, al deposito e al trasferimento anche della cisteina. La cisteina si autoossida rapidamente in cistina producendo i radicali tossici dell'ossigeno. Per sfuggire alla tossicità della cistina, la maggior parte della cisteina non proteica viene raccolta nel glutatione. Inoltre, esercitando un'azione protettiva dalle specie reattive dell'ossigeno, il glutatione è un eccellente scavenger dei prodotti della perossidazione lipidica, come HNE e acroleina, i quali legano le proteine inibendone l'attività. Il glutatione reagisce anche con gli atomi di carbonio saturi, insaturi ed aromatici. Tale detossificazione comporta l'attacco nucleofilo su un atomo di carbonio elettrofilico da parte del GSH. Questa reazione può decorrere spontaneamente, ma molto spesso viene catalizzata dalla glutatione S-transferasi. Il glutatione forma anche complessi metallici attraverso reazioni non enzimatiche. Il GSH interviene nell'immagazzinamento, mobilitazione e rilascio degli ioni dei metalli tra i ligandi, nel trasporto dei metalli attraverso le membrane cellulari, funge da fonte di cisteina per legare i metalli, e da riducente per le reazioni redox che coinvolgono i metalli (35). Il gruppo sulfidrilico della porzione cisteinica del GSH ha un'alta affinità per gli ioni dei metalli come il mercurio, l'argento, il cadmio, l'arsenico, il piombo, l'oro, lo zinco e il rame, formando un complesso termodinamicamente stabile che può essere eliminato dall'organismo. Il glutatione reagisce con molecole radicaliche. Quindi, la possibilità di aumentare i livelli di glutatione potrebbe rivelarsi utile contro lo stress ossidativo.

La *vitamina E*, un composto fenolico, agisce come un antiossidante rimuovendo i radicali liberi mediante l'atomo-H fenolico. Le reazioni della vitamina E, della vitamina C, e del glutatione potrebbero essere collegate con diversi processi di riciclaggio, contribuendo, in tal modo, all'aumento dell'efficienza di queste parti contro lo stress ossidativo.

I *polifenoli* sono sostanze naturali presenti in tutti i frutti e vegetali, come pure in bevande ottenute da piante, quali il tè, il vino rosso e l'olio di

oliva. I flavonoidi comprendono il più vasto gruppo di polifenoli. La loro struttura chimica è composta da un'anello aromatico condensato ad un anello eterociclico e legato ad un secondo anello aromatico. I flavonoidi sono prevalentemente divisi in: antocianine, derivati glicosilati dell'antocianidina, presenti in fiori colorati e frutti, ed antoxantine, composti incolore ulteriormente divisi in diverse categorie che comprendono flavoni, flavani, flavonoli, flavanoli, ed isoflavoni. La notevole attività antiossidante di questi composti è data da numerosi gruppi fenolici idrossilici sull'anello aromatico. La rapida donazione di un atomo di idrogeno al radicale lipidico perossile determina la formazione del radicale polifenolico fenossile (PP<sup>•</sup>) secondo la reazione:  $ROO^{\bullet} + PPH \rightarrow ROOH + PP^{\bullet}$

che può essere stabilizzata attraverso un'ulteriore donazione di un altro atomo di idrogeno o mediante reazione con un'altra molecola radicalica. Inoltre i flavonoidi presentano un'efficiente attività chelante il ferro, per la quale è importante il gruppo 3-OH (36). Gli effetti fisiologici dei flavonoidi sono particolarmente importanti in quelle patologie, come la malattia di Alzheimer, dove l'ipotesi di stress ossidativo è accettata e sostenuta da dati sperimentali. In vitro, i flavonoidi sono capaci di rimuovere gli anioni superossidi (37) ed i radicali idrossilici (38).

Una volta ingeriti, questi composti sono capaci di elevare il livello redox e antiossidante (39). Negli eritrociti i polifenoli migliorano la resistenza cellulare all'insulto ossidativo (40) ed inibiscono l'ossidazione delle lipoproteine plasmatiche a bassa intensità (LDL) (41). L'importanza di queste molecole per la protezione cellulare dallo stress ossidativo va oltre le semplici proprietà di rimozione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS). In uno studio recente sulle cellule neuronali (42), sono stati identificati tre differenti meccanismi di protezione: i flavonoidi possono prevenire la morte cellulare dopo danno da glutammato, attraverso la rimozione di radicali, mantenendo i normali livelli di glutatione e inibendo l'influsso di ioni  $Ca^{2+}$ , che rappresenta

l'ultimo processo delle reazioni a cascata della morte cellulare. Queste proprietà, insieme alle proprietà anti-infiammatorie attribuite ad alcuni polifenoli (43), rendono questa classe di composti idonei all'impiego in quelle condizioni, come la malattia di Alzheimer, in cui lo stress ossidativo prende posto insieme a processi infiammatori ed a deplezione della difesa antiossidante.

*Spezie ed erbe aromatiche* spesso contengono sostanze fenoliche con potenti proprietà antiossidanti e chemopreventive (44). Le spezie costituiscono un'importante classe di alimenti aggiuntivi e sono usati per aumentare la qualità sensoriale degli alimenti. Recenti studi dimostrano che alcuni degli effetti biochimici delle spezie sono dovuti ai loro principi attivi. Il curcumino (*Curcuma longa* Linn, famiglia: Zingiberaceae) viene usato da tempo memorabile come agente colorante e come alimento aggiuntivo nelle preparazioni culinarie indiane (45).

Il principio attivo antiossidante nella *Curcuma longa* è stato riconosciuto come curcumino (1,7-bis[4-Hydroxy-3-methoxyphenyl]-1,6-heptadiene-3,5-dione). Generalmente si suppone che la parte fenolica è responsabile delle proprietà antiossidanti di qualche composto fenolico di pianta. Di conseguenza la chimica radicalica del curcumino, ha focalizzato l'attenzione sul suo anello fenolico (46). È stato considerato il possibile coinvolgimento della parte  $\beta$ -dichetone nell'azione antiossidante del curcumino (47), e, come dimostrato recentemente, si ritiene che la donazione dell'atomo di idrogeno della parte  $\beta$ -dichetone ad un radicale lipidico alchilico o ad un radicale lipidico perossilico, costituisce il meccanismo potenzialmente più importante alla base della sua azione antiossidante.

Analogamente al noto sinergismo tra la vitamina E liposolubile, e l'ascorbato idrosolubile, è stato ipotizzato (48) che il radicale del curcumino, generato dall'azione antiossidante, potrebbe localizzarsi sul margine della membrana cellulare adiacente all'ambiente liquido in un breve "pops out"

della membrana per essere riparato dagli antiossidanti idrosolubili, come le catechine o l'ascorbato. Il curcumino, come un potente antiossidante liposolubile, si localizza all'interno della membrana cellulare, dove sequestra i radicali lipidici e diviene un radicale fenossile. Essendo più lipofilo del curcumino, il radicale fenossile viaggia attraverso la superficie della membrana. A causa dell'alto potenziale di riduzione del radicale fenossile del curcumino (0.8 V, a pH fisiologico 7.4), questo lascia il curcumino nel mezzo per essere facilmente riparato da donatori di elettroni con potenziale di riduzione favorevole, come l'epigallocatechina-3-gallato (0.43 V), la catechina (0.55 V), o la vitamina C (0.28 V). Questa reazione, di trasferimento degli elettroni e dei protoni associati, manterrà ottimali concentrazioni di curcumino a spese degli antiossidanti idrosolubili, nonostante il suo rapido turnover e la sua scarsa captazione fisiologica. Inoltre, i radicali liberi del curcumino possono anche reagire a vicenda o con altri radicali liberi formati, in entrambi i casi generando prodotti stabili come dimeri del curcumino, vanilina e acido ferulico (49) o, mediante un legame perossidico in posizione 3' dell'anello fenolico del curcumino, agganciando prodotti che generano, attraverso la reazione intramolecolare Diels-Alder, reazione di cicloadizione [4+2] che porta alla formazione di composti stabili non radicalici. (50).

Il curcumino contiene due gruppi carbonilici elettrofilici  $\alpha,\beta$ -insaturi, che possono reagire con i nucleofili come il glutathione (51). È stato recentemente dimostrato che, in virtù della sua funzione di accettore nella reazione di Michael (addizione coniugata in cui un nucleofilo debole si lega al  $C\beta$  di un composto carbonilico  $\alpha,\beta$  insaturo) e delle sue caratteristiche elettrofiliche, il curcumino e parecchi altri composti polifenolici sono in grado di indurre le reazioni della Fase I (catalizzate dagli isozimi della citocromo P450, reazioni di funzionalizzazione che inseriscono o smascherano gruppi -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH) e della Fase II (reazioni di coniugazione che permettono



il legame il metabolita ad una molecola indogena aumentando la polarità e permettendone l'eliminazione) del processo di detossificazione (52,53), come l'inibizione degli enzimi COX-1 e COX-2 (54), e la stimolazione della glutatione-S-trasferasi (55). Oltre alla sua capacità di rimozione dei radicali liberi carcinogenici (56), il curcumino interviene anche nei processi di accrescimento cellulare attraverso l'inibizione delle protein chinasi. Sebbene l'esatto meccanismo attraverso il quale il curcumino promuove questi effetti rimanga ancora da chiarire, le proprietà antiossidanti di questo pigmento giallo sembrano costituire una componente essenziale alla base delle sue attività biologiche pleiotropiche. Di particolare interesse è la capacità del curcumino di inibire la perossidazione lipidica, e di sequestrare e neutralizzare efficacemente le specie reattive dell'ossigeno (superossido, radicali perossilici e idrossilici) (57) e le specie radicaliche del NO (ossido nitrico e perossinitrito) (58). A questo riguardo è stato dimostrato che il curcumino è parecchie volte più efficace della vitamina E (59).

Va notato che, anche se la maggior parte degli enzimi citoprotettivi è localizzata in sede intracellulare, gli agenti antiossidanti sono localizzati in sede sia intra- che extracellulare (7).

### ***Meccanismo di difesa "Heat shock response"***

E' stato dimostrato che lo stress ossidativo altera l'espressione degli enzimi antiossidanti nei mammiferi (60) e inoltre stimola l'espressione di numerosi fattori di trascrizione che si legano al DNA inclusi AP-1, fos, jun, myc, erg-1, SAPK e l'NFkB (61). E' ormai noto che le cellule sono continuamente sottoposte a condizioni che provocano stress di tipo acuto o cronico. Allo scopo di adattarsi alle differenti condizioni ambientali e ai diversi tipi di insulti le cellule eucariote hanno sviluppato un sistema di differenti risposte, che rivelano e controllano diverse forme di stress (62). Una

di queste risposte conosciuta come “heat shock response” ha destato notevole interesse come meccanismo fondamentale per la sopravvivenza cellulare in diverse condizioni sfavorevoli. Nelle cellule dei mammiferi l’induzione della “heat shock response” richiede l’attivazione e la traslocazione nel nucleo di uno o più fattori di trascrizione dell’heat shock che controllano l’espressione di una serie specifica di geni, denominati vitageni (63), codificanti le Hsps citoprotettive. Recenti studi hanno dimostrato che l’heat shock response contribuisce a stabilire una condizione citoprotettiva in una grande varietà di condizioni patologiche, come ischemia e danno da riperfusione, stati febbrili e infiammatori, disordini metabolici, traumi tissutali e cellulari, invecchiamento, infezione e cancro. La “stress response” determina l’espressione genica in risposta a variazioni ambientali come: alte temperature, radiazione, esposizione a eccitotossine e ad altre condizioni stressogene che portano alla denaturazione delle proteine. Quindi, l’induzione delle Hsps non è soltanto un indice di stress fisiologico, ma è utilizzato dalle cellule per i processi di riparazione, dopo gli insulti, allo scopo di prevenire il danno conseguente all’accumulo di tali proteine denaturate (64).

Le Hsps possono essere di tipo inducibile e costitutivo. La forma costitutiva svolge funzioni fisiologiche di base. Tuttavia, alcune di queste sono up-regolate dallo stress. La forma inducibile previene la denaturazione delle proteine e l’assemblaggio anomalo dei polipeptidi durante l’esposizione a condizioni stressogene. Le proteine denaturate inducono le stress proteins. La famiglia di Hsps di 70-kDa è una delle più studiate. Questa famiglia comprende la forma espressa costitutivamente Hsc-70 e la forma inducibile Hsp-70 detta anche Hsp-72. Un’altra importante famiglia di Hsps è rappresentata dalla Hsp-32 emeossigenasi che comprende la forma HO-2 costitutiva e l’inducibile HO-1. Quest’ultima famiglia attraverso la formazione della bilirubina, un antiossidante, a partire dal gruppo eme, contribuisce alla difesa antiossidante nelle cellule e produce, inoltre,

monossido di carbonio, una molecola vasoattiva coinvolta nella regolazione del pathway dell'NO (65). Il gene HO-1 è redox-regolato perché contiene nel suo promotore una regione chiamata elemento responsivo antiossidante (ARE antioxidant responsive element) simile a quello di altri enzimi antiossidanti a cui si legano particolari fattori di trascrizione come l'Nrf2 o l'NFkB sensibili all'alterazione dell'equilibrio redox; di fatto, lo stress nitrosativo e la deplezione di GSH up-regolano la proteina. E' stato visto che le cellule che overesprimono le Hsps sono resistenti a diversi tipi di agenti ossidanti e all'heat shock; le Hsps svolgono un ruolo protettivo contro il danno ossidativo al DNA (66). L'evidenza sperimentale che: a) l'inibizione delle difese antiossidanti aumenta la suscettibilità all'heat shock; b) le Hsps conferisce resistenza allo stress ossidativo (67); c) l'induzione delle Hsp-70, inibita da composti antiossidanti, come i flavonoidi, suggerisce una correlazione tra meccanismi di stress ossidativo e l'induzione delle Hsps. Inoltre, l'NO ha un ruolo nell'induzione delle Hsp70 (68).

Il sistema della *tioredoxina*, costituito essenzialmente dall'enzima tioredoxina reduttasi (TrxR) e dalla sua proteina correlata tioredoxina (Trx), ha suscitato un notevole interesse da parte di diversi ricercatori e, alla luce delle nuove evidenze sperimentali, rappresenta uno dei principali sistemi multifunzionali ossidoriduttivi ubiquitari deputato alla regolazione dell'equilibrio redox della cellula (69). La Tioredoxina (Trx) è uno dei membri di una famiglia di proteine redox-attive evolutivamente più conservate, dotate di un centro catalitico disulfidrilico/ditiolico all'interno della sequenza del sito attivo (-Cys-Gly-Pro-Cys-), il quale viene sottoposto a reazioni reversibili di ossidazione a livello dei residui di cisteina in seguito alla riduzione dei ponti disulfidrilici di un'ampia varietà di proteine target ossidate (70). La tioredoxina (Trx) si è evoluta simile ad una proteina chaperonina provvedendo al mantenimento della struttura ditiolica/disulfidrilica di proteine biologiche funzionali. Infatti, dimostrazioni

scientifiche mostrano che la Trx si lega a specifiche proteine, modulandone la conformazione strutturale. Il sistema della tioredoxina/tioredoxina reduttasi, originariamente identificato in *Escherichia coli* nel 1964 principalmente come cofattore ditiolico, donatore di elettroni per la ribonucleotide reduttasi, uno degli enzimi chiave richiesto per la biosintesi del DNA, svolge un ruolo essenziale per la vitalità cellulare limitando lo stress ossidativo direttamente attraverso l'elicitazione dei suoi effetti antiossidanti ed indirettamente mediante interazioni con altre proteine biologiche (71). Numerose evidenze sperimentali dimostrano che nei mammiferi la regolazione redox di molti processi cellulari è data dalla cooperazione tra il sistema della tioredoxina e quello del glutatione (72). Infatti, entrambi i sistemi sono dei sensori cellulari coinvolti in una varietà di pathway redox-dipendenti come l'approvvigionamento di equivalenti riducenti per la ribonucleotide reduttasi, un enzima coinvolto nella prima fase della sintesi dei deossiribonucleotidi per la riparazione del DNA, e per la metionina sulfossido reduttasi, un enzima coinvolto nella difesa antiossidante ed infine nella regolazione del bilancio redox cellulare (70). Il sistema della Trx è considerato uno dei sistemi chiave deputati al mantenimento dell'omeostasi ossidoriduttiva del microambiente cellulare in cooperazione sinergica con il sistema redox del GSH. Nel loro insieme, costituiscono un potente sistema antiossidante deputato al controllo redox dell'espressione genica, della trasduzione del segnale, della proliferazione cellulare, della protezione cellulare contro lo stress ossidativo, delle funzioni anti-apoptotiche, degli effetti mediati da fattori di crescita e da citochine, così come alla regolazione dello stato redox dell'ambiente extracellulare (73). Il promotore del gene della Trx contiene una serie di elementi di risposta allo stress, vari fattori di trascrizione che legano siti come SP1, AP-1, NF-kB ed elementi di risposta antiossidante (ARE) (5). A differenza del glutatione ridotto (GSH), il quale è ampiamente responsabile del basso potere redox e del contenuto globale dei gruppi tiolici liberi

all'interno della cellula e degli organelli a causa della sua elevata concentrazione intracellulare (1-10 mM), il sistema della tioredoxina può svolgere un ruolo critico nella regolazione redox di proteine tioliche bersaglio, coinvolte principalmente nella trasduzione del segnale e nella regolazione dell'espressione genica (74). Inoltre, la tioredoxina (Trx), la quale si comporta essenzialmente come una proteina solubile dopo disfacimento delle cellule, esiste in un'isoforma predominante citoplasmatica (Trx-1) ed una mitocondriale (Trx-2) (75). Studi molecolari mostrano che sia l'isoforma citoplasmatica che quella mitocondriale della Trx proteggono dallo stress ossidativo ed entrambe sono indispensabili per la vitalità delle cellule dei mammiferi (76).

Data l'enorme quantità di funzioni redox svolte dalla Trx, risulta plausibile affermare che essa costituisce una molecola critica indispensabile per la vitalità cellulare. La sovraespressione del sistema della Trx/TrxR è generalmente associata all'attivazione di meccanismi di tolleranza cellulare allo stress ed, in generale, ad una resistenza al danno ossidativo e/o nitrosativo mediato da un'ampia varietà di agenti stressogeni, inclusi composti quali la doxorubicina e l'etoposide (77-79). La Trx svolge un ruolo citoprotettivo contro differenti forme di stress in una varietà di sistemi biologici. Essa è stata caratterizzata fondamentalmente come una proteina stress-inducibile dotata di una tipica localizzazione intracellulare citosolica (75). Molti stimoli chimico-fisici, come l'irradiazione UV e il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ), inducono l'espressione e la secrezione della Trx come molecola redox-sensibile con attività cytokine-like e chemokine-like che previene il danno cellulare dallo stress ossidativo. Inoltre trattamenti di cellule in cultura con gli esteri del forbolo, il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ), l'ipossia, il chemioterapico cisplatina e l'emina, causano la traslocazione della TrxR dal citoplasma al nucleo dove regola l'attivazione redox e l'attività di legame al DNA di fattori di trascrizione critici (Jun, Fos, p53, CREB, PEBP2/CBF, Myb) che sono

coinvolti in processi fondamentali come l'espressione genica, la crescita cellulare e l'apoptosi. La Trx-1, l'isoforma più estesamente studiata, è essenzialmente una proteina citosolica solubile priva di uno specifico segnale di localizzazione. Diversi studi indicano che la Trx è espressa costitutivamente, associata a proteine sulfidriliche sulla superficie della membrana plasmatica di differenti tipi cellulari (75). I livelli plasmatici di Trx, in individui normali, varia da 20 a 30 ng/ml (80,81) e aumenta in certe malattie umane come l'infezione da HIV e il cancro (5). Elevati livelli di Trx, possono contribuire ad aumentare la proliferazione di cellule cancerogene e la resistenza alla chemioterapia con diversi meccanismi come la stimolazione della sintesi del DNA e l'attivazione di fattori trascrizionali redox-modulati. Dati recenti suggeriscono che la Trx-1 è coinvolta nelle vie di segnali di fattori di crescita nervosi (NGF). L'NGF è un fattore neurotrofico che regola lo sviluppo, il mantenimento e le funzioni del sistema nervoso centrale, che attiva l'espressione della Trx-1 attraverso l'AMP ciclico (cAMP) e gli elementi di risposta (CREs) presenti nel promotore del gene della Trx-1 ed induce anche la traslocazione nucleare della Trx-1 (5). Dati sperimentali suggeriscono che il sistema Trx/TrxR, oltre alla sua capacità intrinseca di regolare la funzione redox di proteine target biologicamente importanti attraverso reazioni ossidoriduttive di scambio tra gruppi tiolici e legami disulfidrilici, svolge un ruolo cruciale nella trans-attivazione del gene per l'HO-1 (82), la quale costituisce un'importante proteina heat shock dotata di effetti citoprotettivi pleiotropici derivati dalla degradazione dell'eme con conseguente formazione di bilirubina e biliverdina (83). Oltre al ruolo di fonte di equivalenti riducenti, la Trx agisce come antiossidante o scavenger dei ROS. Infatti, la Trx elimina l'ossigeno singoletto, il radicale idrossido e il perossido d'idrogeno. Infine l'espressione NO-dipendente della Trx ha dimostrato che essa è coinvolta nella neuroprotezione contro lo stress ossidativo mediato da estrogeni (5).

La *carosina* è un naturale dipeptide ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) presente nelle cellule dei mammiferi (84) ad alte concentrazioni (2-20 mM) (85) in particolare nella neuroglia e in certi tipi di neuroni. A concentrazioni fisiologiche, questo dipeptide ha anche proprietà anticarcinogenica, antiglicante e antiinvecchiamento agendo come antiossidante (86). Poiché la  $\beta$ -alanina è un ammino acido non proteogenico, è evidente che la carosina non è prodotta dal catabolismo delle proteine, ma è invece sintetizzata enzimaticamente dalla carosina sintetasi, un enzima presente nel cervello e nel muscolo che mostra un'ampia specificità di substrato. L'idrolisi della carosina è catalizzata da due enzimi recentemente clonati e caratterizzati. Entrambi gli enzimi appartengono alla famiglia M20 delle metalloproteasi. L'enzima definito CN1 presenta scarsa specificità e le caratteristiche dell'enzima precedentemente definito dipeptidasi X-His o carosinasi (5). L'enzima definito CN2 mostra invece un'ampia specificità di substrato ed è ubiquitativamente espresso come l'enzima precedentemente definito come dipeptidasi citosolico non-specifico (5).

È stato dimostrato che la carosina previene la tossicità neurale in vitro (87,88) e protegge le cellule neurali dal danno ischemico (89) e dalle forme aggregate del peptide  $\beta$ -Amiloide (90). Inoltre, la carosina protegge neuroni isolati dalle specie reattive dell'ossigeno overprodote dagli insulti eccitotossici dell'N-methyl-D-aspartato (91), previene l'inattivazione in vivo della Cu-Zn-SOD nei topi SAMP (senescence accelerated mouse prone), un effetto associato ad una prolungata media della life-span (92). Ciò suggerisce che la carosina può ritardare i processi di invecchiamento, come dimostrato in vitro, in colture di cellule umane senescenti (93,94). Questo dipeptide, reagendo non-enzimaticamente con gruppi proteici carbonilici, può prevenire il conseguente cross-linking e la degradazione delle proteine glicosilate (91). Questo processo definito "carosilazione" potrebbe essere rilevante durante l'invecchiamento, dove è stato osservato un significativo accumulo di gruppi

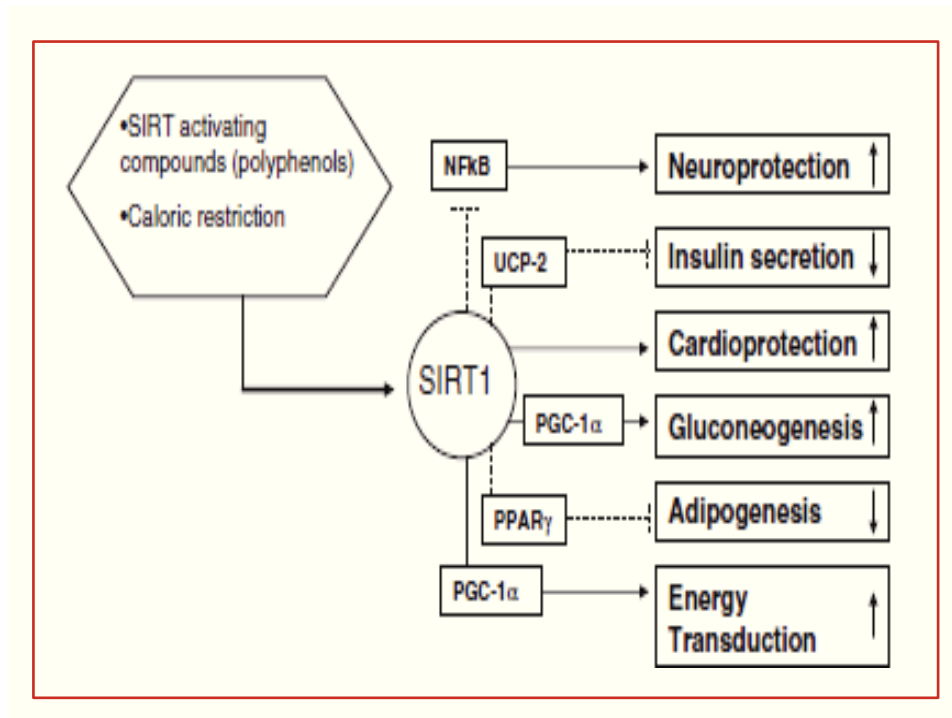
carbonilici a livello proteico, derivanti da fenomeni di glicazione (95). L'aumentata formazione di proteine carbonilate, che avviene durante l'invecchiamento, sopprime l'attività proteosomica (94,96,97). I polipeptidi invecchiati, infatti, potrebbero anche essere degradati dai proteosomi 20S o cross-linkati per formare aggregati intrattabili dalla proteolisi ed inibire l'attività proteosomica. In queste condizioni, la carnosilazione e le proteine glicate/ossidate, attraverso l'inibizione del cross-linking con le normali macromolecole, potrebbero influenzare il destino ed il significato biologico di importanti proteine durante condizioni di attacco radicalico e di stress ossidativo, come i processi di invecchiamento. Inoltre, è stato recentemente riportato che la carnosina può agire come inibitore selettivo dell'attivazione della guanilato ciclastasi NO-dipendente, suggerendo un suo utilizzo per il trattamento di diversi disordini (tumori, sepsi, asma, ecc.) associato ad un'attività aberrante del sistema di segnale intracellulare: guanilato ciclastasi-cGMP dell'NO-solubile (98). Più recentemente, è stato dimostrato che la carnosina ed alcuni suoi analoghi sintetici neutralizzano il danno perossinitrito-dipendente, come la nitratura della tiroxina libera e dell' $\alpha_1$ AP, e la modificazione dell'LDL (99,100). Il perossinitrito, agendo come ossidante e nitrante altamente tossico, si decompone rapidamente, generando specie reattive capaci di reagire con differenti molecole biologiche, come tioli, lipidi, aminoacidi, antiossidanti e acidi nucleici, ed è implicato in numerosi stati patologici umani (101,102).

Le *sirtuine* sono un gruppo di proteine strettamente associate all'invecchiamento, al metabolismo ed alla resistenza allo stress nei diversi organismi.

Nelle cellule dei mammiferi sono state identificate sette sirtuine. Le SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5 e SIRT6 sono deacetilasi NAD-dipendenti, invece le SIRT4 e SIRT6 sono ADP-ribosiltransferasi, mentre l'attività di SIRT7 non è ancora nota (103). La famiglia delle sirtuine dell'istone



deacetilasi (HDACs), fu chiamata così per la sua omologia con il gene Sir2 (*silent information regulator 2*) di *Saccharomyces cerevisiae* 2. Nel lievito, l'iper-espressione di Sir2 ha la funzione di mediare gli effetti della restrizione calorica sul prolungamento del “life span”, quindi promuovono la longevità (104).



Come i loro omologhi nel lievito, le sirtuine dei mammiferi (SIRT1-7), sono HDACs di classe III e richiedono  $\text{NAD}^+$ , come cofattore per deacetilare i vari substrati, a partire dagli istoni fino ai regolatori trascrizionali. Le sirtuine mediante questa attività regolano importanti processi biologici, come l'apoptosi, il differenziamento cellulare e l'omeostasi del glucosio. La deacetilazione e l'ADP-ribosilazione sembrano essere mediate dalle sirtuine. Le sirtuine, nella deacetilazione rimuovono il gruppo acetile dai substrati proteici per generare 2,3-O-acetil-ADP-ribosio, mentre nella ribosilazione, parte dell'ADP ribosil è trasferita ai substrati proteici. Le sirtuine possono essere inibite o indotte mediante il processo di deacetilazione proteica (103).

Diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato il ruolo della proteina SIRT1 umana nella sopravvivenza cellulare. SIRT1 è specificamente associata con la proteina p53, un soppressore tumorale, poiché la deacetilazione di p53 porta ad una inattivazione della trascrizione, la deacetilazione di p53 aumenta la sopravvivenza cellulare in condizioni di stress. Inoltre la deacetilazione di p53 mediata da SIRT1 previene anche la senescenza cellulare e l'apoptosi indotta dal danno cellulare e stress. SIRT1 regola importanti aspetti della biogenesi mitocondriale mediante la deacetilazione del cofattore PGC-1 $\alpha$ . L'upregolazione dell'attività mitocondriale può essere un beneficio terapeutico per varie patologie come l'invecchiamento, i disordini metabolici e le malattie mitocondriali. Pertanto, un incremento della biogenesi mitocondriale può avere un effetto *anti-aging*. Questi studi forniscono importanti indicazioni sull'attività di SIRT1 ed offrono un promettente approccio per il trattamento dei disordini metabolici. Infine, altre evidenze sperimentali hanno suggerito che SIRT1 determina un decremento significativo della morte cellulare neuronale indotta dal peptide  $\beta$ -amiloide attraverso l'inibizione della via di signalling dell'NF-kB (105).

### ***Invecchiamento***

L'invecchiamento è un complesso processo biologico caratterizzato da un graduale declino delle funzioni fisiologiche e biochimiche di molti organi ed è considerato uno dei più significativi fattori di rischio per le malattie neurodegenerative legate all'età, come la malattia di Alzheimer o di Parkinson. In particolare, l'invecchiamento è accompagnato da un generale declino delle funzioni fisiologiche nel sistema nervoso centrale (CNS).

I cambiamenti correlati all'età del cervello includono riduzione del supporto trofico, decremento dell'attività enzimatica del proteosoma, disfunzione mitocondriale, cambiamenti all'interno di molti ambienti pro-infiammatori e un aumento della produzione delle specie reattive dell'ossigeno. La teoria dei radicali liberi dell'invecchiamento ha postulato che i ROS possono direttamente produrre danno ossidativo a molecole biologiche critiche: proteine, DNA e lipidi. Il danno ossidativo per le macromolecole cellulari come il DNA, le proteine e i lipidi, si accumula con l'età ed è stato postulato che è il principale tipo di danno endogeno fortemente coinvolto nel processo d'invecchiamento. In realtà, quando i neuroni post mitotici sono danneggiati dallo stress ossidativo, essi non possono essere sostituiti, pertanto sulla popolazione neuronale si instaurano gli effetti dannosi del danno ossidativo. Il danno ossidativo è riflesso dall'aumento dei livelli delle proteine carbonilate e dal decremento dei livelli delle proteine tioliche. Le proteine carbonilate, tra i differenti tipi di modificazioni post traslazionali, possono essere considerate dei bio-markers utili per studiare l'aumento delle proteine modificate ossidativamente. Numerosi studi indicano che i livelli di proteine ossidate, con la presenza dei gruppi carbonili, aumentano progressivamente con l'età in estratti di cervello di ratti di età differente(106).

## ***Sclerosi Multipla***

La sclerosi multipla (SM) è una patologia neurodegenerativa, a probabile genesi immuno-mediata, caratterizzata da focolai infiammatori di demielinizzazione nel sistema nervoso centrale (SNC), che coinvolgono encefalo, midollo spinale e nervi cranici, in particolare il nervo ottico. Molti studi hanno evidenziato come il danno indotto dalla SM non sia solo di natura demielinizzante, ma che ci sia una forte componente assonale, come anche nella encefalite allergica sperimentale (EAS), che è responsabile dei segni e sintomi neurologici permanenti presenti spesso nei pazienti affetti da SM.

Attualmente, gli schemi terapeutici in uso nella SM sono costituiti da terapie immunomodulanti, che agiscono a diversi livelli della regolazione del sistema immunitario, e/o immunosoppressive, che determinano uno “spegnimento” della risposta immune. Tali terapie non sono risolutive e sono parzialmente efficaci nei confronti delle “ricadute” (relapses) della malattia e non sono in grado di prevenire il danno assonale tardivo e la disabilità dei pazienti. Le nuove terapie non immunomodulanti neuroprotettive potrebbero avere un ruolo chiave nella prevenzione della neurodegenerazione, se associate con le terapie tradizionali nella SM (107-109).

Da un punto di vista anatomopatologico, la SM è caratterizzata da infiltrazioni perivenulari di linfociti e macrofagi che determinano un danno demielinizzante ed assonale del SNC, a cui corrisponde, a livello clinico, un coinvolgimento di uno o più sistemi funzionali del SNC (motorio, sensitivo, sfinterico, etc).

Secondo il tipo di progressione vengono distinte classicamente 4 forme di SM:

1. Relapsing-Remitting (SMRR), caratterizzata dalla presenza di ricadute e remissioni che si verificano ad intervalli di tempo variabili e che determinano un recupero più o meno completo delle funzioni neurologiche

coinvolte tra una ricaduta e l'altra. Questa forma è la più frequente (85% dei casi di SM)

2. Secondariamente progressiva (SMSP), che esordisce nello stesso modo della SMRR. Ad un certo punto, tuttavia si ha una modificazione del decorso clinico della malattia, tale da indurre un deterioramento continuo delle funzioni neurologiche, non più associato ad attacchi acuti. Questa forma causa una disabilità neurologica irreversibile e costituisce l'evoluzione naturale della maggior parte delle forme di SMRR.

3. Primariamente progressiva (SMPP) che rappresenta circa il 15% dei casi. Fin dall'esordio della malattia sono soggetti ad un costante e progressivo deterioramento delle funzioni del SNC, in assenza di attacchi. Di solito insorge in età più avanzata rispetto alle forme RR e SP e la disabilità si sviluppa più velocemente.

4. Progressiva-Recidivante (SMPR) che rappresenta una sovrapposizione di SMPP e SMSP ed è presente in circa il 5% dei pazienti affetti da SM. Questi pazienti, fin dall'esordio della malattia, vanno incontro ad un deterioramento progressivo della loro condizione; tuttavia, come i pazienti affetti da SMSP, subiscono attacchi occasionali che si sovrappongono al decorso progressivo.

Secondo la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), l'impatto della malattia sulla qualità di vita del paziente può essere descritto in termini di "impairment", che corrisponde all'insieme dei deficit neurologici prodotti dalla malattia; "disability", che rappresenta le limitazioni del paziente nelle attività della vita quotidiana, ed "handicap", che riflette le limitazioni nelle attività sociali e lavorative.

Attualmente, la valutazione del grado di severità della SM e, cioè, delle sequele neurologiche prodotte dal danno anatomico che subisce il tessuto nervoso, si effettua tramite una serie di scale cliniche fra le quali, la più utilizzata è quella proposta da Kurtzke e denominata Expanded Disability

Status Scale (EDSS) (110). Nell'EDSS si analizzano 8 sistemi funzionali, ad ognuno dei quali si attribuisce un punteggio che va da 0 a 5 o da 0 a 6 con aumenti di 0,5 punti. Il punteggio finale va da 0 (esame neurologico normale) a 10 (massimo grado di gravità). Questa scala è una misura riassuntiva di "impairment" e "disability", molto utile per definire l'impatto della malattia sulla vita di relazione dell'individuo e per controllare l'effetto delle eventuali terapie.

Nonostante numerose evidenze indichino che la SM sia una patologia multifattoriale, causata da una complessa interazione tra fattori genetici ed ambientali, non è ancora chiaro quali siano gli elementi causali che determinano il suo decorso così variabile. È generalmente accettato che infezioni virali del SNC, alterazioni vascolari e/o disturbi del sistema immunitario siano implicati nella patogenesi della malattia (111,112). Una volta attivato, il sistema immunitario determina un processo di attacco e distruzione della guaina mielinica e degli oligodendrociti che costituisce il marker patologico della malattia: la "placca" attiva, che denota demielinizzazione in atto, la demielinizzazione corticale e il danno diffuso della sostanza bianca dei centri semiovali a livello sottocorticale e periventricolare, quest'ultimo particolarmente evidente negli stadi avanzati della patologia (112, 113).

Numerose evidenze indicano che il SNC risponda agli attacchi da parte del sistema immune attraverso la modulazione del suo metabolismo e l'espressione di geni, che codificano determinati tipi di proteine (114). Inoltre, citochine, immunoglobuline e immunocomplessi promuovono la sopravvivenza degli oligodendrociti, tramite la produzione di heat shock proteins (HSPs) endogene ed altre molecole neuro protettive, le quali indicano che il bilancio tra specie ossidanti ed antiossidanti di queste cellule è fondamentale per far fronte al danno indotto dalla SM (115-118). Infatti, l'adattamento e la sopravvivenza cellulare richiede la capacità, da parte delle

cellule stesse, di rilevare gli insulti proteotossici e di coordinare la risposta protettiva nei confronti dello stress ossidativo e il network delle proteine chaperone, che opera il controllo sulle condizioni delle proteine (119). Nonostante l'apparente capacità delle proteine chaperone e di altri componenti dell'omeostasi di mantenere il corretto *fold*ing proteico, i neuroni e la glia presentano una scarsa adattabilità nei confronti dello stress ossidativo, soprattutto in malattie come la SM, dove tale meccanismo è particolarmente marcato (120).

In queste condizioni, il declino delle attività biosintetiche e di quelle riparative, che compromette l'attività del proteasoma, è fortemente influenzato dai cosiddetti "vitageni", i quali hanno un ruolo fondamentale nell'*aging* e costituiscono un legame importante tra omeostasi proteica, stress ossidativo e meccanismi antidegenerativi (121).

I vitageni codificano le heat shock proteins (Hsp) Hsp32, Hsp70, il sistema delle sirtuine e della tioredoxina. A livello del SNC, la sintesi di queste componenti avviene dopo ipertermia, alterazioni dell'ambiente redox intracellulare, esposizione a metalli pesanti, analoghi degli aminoacidi o farmaci citotossici (121).

Mentre l'esposizione prolungata a condizioni acute di stress è fortemente dannosa e porta a morte cellulare, la sintesi delle Hsp può promuovere una condizione cellulare di tolleranza allo stress e di citoprotezione nei confronti di versi insulti metabolici e patologie, inclusi ipossia, stroke, varie forme comiziali, traumi, malattie neurodegenerative e invecchiamento (120).

Numerose evidenze indicano che la SM sia una patologia multifattoriale, causata da una complessa interazione tra fattori genetici ed ambientali, ma non è ancora stato chiarito quali siano gli elementi causali che determinano il suo decorso così variabile. Diversi risultati sperimentali sostengono l'ipotesi che il SNC risponde agli attacchi da parte del sistema

immune attraverso la modulazione del suo metabolismo e l'espressione di geni, che codificano determinati tipi di proteine. È stato dimostrato che citochine, immunoglobuline e immunocomplessi promuovono la sopravvivenza degli oligodendrociti, mediante la produzione di heat shock proteins (HSPs) endogene ed altre molecole neuro protettive, le quali indicano che il bilancio tra specie ossidanti ed antiossidanti di queste cellule è fondamentale per far fronte al danno indotto dalla SM. La modulazione farmacologica dei pathways che controllano lo stress cellulare costituisce un interesse di importanza crescente per le implicazioni sul trattamento di malattie cardiovascolari, neoplastiche e neurodegenerative.

### *Antiossidanti e Neuroblastoma*

Recenti studi dimostrano che una minima quantità di radicali liberi, che fino ad oggi sono stati considerati solo causa di invecchiamento, è condizione necessaria per un'ottimale funzionalità delle cellule perché porta ad una maggiore efficienza dei sistemi di difesa e una maggiore sopravvivenza cellulare (68).

Bis(2-hydroxybenzylidene)acetone è un potente induttore della risposta della fase 2 attraverso la via dell' Keap1-Nrf2-ARE, per studiare gli effetti protettivi di molecole ad attività antiossidante, tra cui l'HBB-2.

L'HBB-2 è un doppio accettore della reazione di Michael, che reagisce direttamente con Keap-1, la proteina sensore per l'induzione, che porta all'aumento della trascrizione dei geni della fase 2 e protegge dalla tossicità ossidante. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'HBB-2 è un potente agente chemoprotettivo; infatti, basse concentrazioni di HBB-2, aumentano marcatamente l'attività della NAD(P)H:quinone, accettore della ossido reduttasi 1 (NQO1), la glutazione reduttasi e i livelli totali di glutatione, tre



markers della risposta della fase 2, mentre ad alte concentrazioni (nel range di micromolare) causa il blocco del ciclo cellulare G2/M e l'apoptosi (122).

E' stato ipotizzato il ruolo di un composto antiossidante di sintesi come il bis(2-hydroxy-benzilidene) acetone o HBB-2, quale modulatore dei vitageni per un possibile suo impiego *in vivo*. E' stato ipotizzato anche un suo effetto neuroprotettivo in cellule umane di neuroblastoma esposte a stress nitrosativo indotto dal SIN-1, per sostenere l'ipotesi che l'HBB potrebbe avere effetti anti-aging nel Sistema Nervoso centrale (SNC).

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono un subclone neuroblastico estesamente caratterizzato della linea cellulare SK-N-SH (123,124) ricavato nel 1970 dal tessuto di un neuroblastoma metastatico di una bambina di quattro anni (125). I neuroblastomi sono tumori ad insorgenza in età pediatrica che originano da neuroblasti immaturi durante lo sviluppo del sistema nervoso periferico (126).

Le cellule della linea SH-SY5Y sono una popolazione cellulare dalla morfologia simil-neuroblastica, con un corpo cellulare a forma di goccia (127) e piccoli neuriti, che crescono formando piccoli aggregati o clusters (125, 128), mentre una parte minore si trova in sospensione e rappresenta le cellule in mitosi.

Queste cellule costituiscono un modello ben caratterizzato per lo studio *in vitro* della differenziazione in un fenotipo neuronale-simile inducibile da vari agenti differenzianti esogeni, come l'acido retinoico, gli esteri del forbolo, il fattore di crescita dei nervi (NGF), e l'analogo membrana-permeabile del cAMP, il dibutiril-cAMP (124, 129, 130). La differenziazione di queste cellule è associata all'estensione di lunghi neuriti e può essere quantificata tramite analisi morfologica della neuritogenesi (124,127).

La linea SH-SY5Y è molto usata anche come modello per lo studio della morte cellulare neuronale indotta da stress ossidativi, associato a diverse malattie neurodegenerative croniche come il morbo di Parkinson, di

Alzheimer e di Huntington (131). Sono utilizzate anche come modello per la neurotrasmissione simpatica e quella dopaminergica nello studio del morbo di Parkinson (132).

Esprimono i recettori adenosinici A1 ed A2A e, in presenza di inibitori delle fosfodiesterasi, i livelli del cAMP aumentano anche in assenza di una stimolazione dell'adenilato ciclasi recettore-mediata, evidenza che suggerisce che i livelli basali del nucleotide ciclico siano soggetti ad un alto turnover (133).

Altre caratteristiche della linea cellulare comprendono la capacità di convertire il glutammato in GABA, la colina in acetilcolina, e la presenza di attività dopamina- $\beta$ -idrossilasi (Biedler et al., 1978). Esprimono i recettori oppioidi  $\mu$  e  $\delta$ , in particolare i  $\delta 2$  (134), ed i recettori  $\alpha 2$  adrenergici (130). Sono anche considerate un modello appropriato per lo studio dei recettori  $\sigma$  (132). Le cellule esprimono inoltre i canali per il calcio, sia di tipo N sia di tipo L, i recettori muscarinici (M3) e nicotinici, i recettori per il neuropeptide Y (recettori Y2) (132, 135).

### ***Lesione al Midollo Spinale (SCI) e Carnosina***

La lesione al midollo spinale (SCI) è una patologia fortemente disabilitante, che può avere origine traumatica e non, e può portare spesso a disfunzioni molto devastanti. La SCI causa effetti fisici e psicologici non solo all'individuo, ma anche alla famiglia ed alla società. Durante gli anni precedenti sono state condotte varie ricerche per chiarire il meccanismo molecolare della SCI. Studi sperimentali e clinici hanno suggerito che una SCI acuta è un processo a due step, che coinvolge un meccanismo primario ed uno secondario. La lesione primaria del midollo spinale è dovuta ad un iniziale danno meccanico dovuto ad una deformazione locale della spina. Dopo il trauma meccanico si ha una compressione diretta, con alterazioni agli

elementi neuronali ed ai vasi sanguigni, con frattura e sostituzione di frammenti ossei o di materiale del disco. Il secondo meccanismo comprende una serie di alterazioni dei processi biochimici e cellulari che coinvolgono gli elettroliti, formazioni di radicali liberi, ischemia vascolare, edema, reazione infiammatoria post traumatica, apoptosi o morte cellulare geneticamente programmata ed altri processi (136). È noto che una lesione neuronale progressiva è data da una combinazione di fattori secondari che includono ischemia, alterazioni biochimiche, eccitotossicità, accumulo di neurotrasmettitori, ossidazione proteica e lipidica associata con la generazione di radicali liberi (137, 138). Inoltre, le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da una elevata produzione di molecole reattive dell'ossigeno (ROS) come l'anione superossido, il perossido d'idrogeno e il perossinitrito (139). L'ossidazione dei lipidi, delle proteine e del DNA, mediata dai radicali liberi, contribuisce ad aumentare i meccanismi di alterazione neuronale come l'ipoperfusione del midollo spinale, sviluppo di edema, difetti della conduzione assonale ed alterazione del metabolismo energetico (140). L'importanza della mediazione del danno cellulare dei radicali liberi nella SCI è sostenuta da un grande numero di studi sperimentali e clinici, che dimostrano l'efficacia di agenti ossidanti nel migliorare la lesione neuronale (106,119,141,142). L'L-carnosina, piccola molecola composta dagli amminoacidi L-istidina e  $\beta$ -alanina, è un dipeptide che è stato trovato a concentrazioni relativamente alte in diversi tessuti del corpo come nel muscolo scheletrico, nel muscolo cardiaco, nello stomaco, nel tessuto nervoso e nel cervello. Sebbene non è ancora conosciuto l'esatto ruolo biologico di questo peptide, numerosi studi hanno dimostrato che, sia a livello dei tessuti che a livello degli organi, conferisce potenti e specifiche proprietà antiossidanti, prevenendo e riducendo l'accumulo di prodotti ossidati derivanti dalla perossidazione lipidica (LPO) delle membrane biologiche, compresa una stupefacente azione anti-aging (143). Recentemente è stato

proposto che l'L-carnosina, in vivo, agisce come antiossidante (144, 145). È stato dimostrato l'effetto neuroprotettivo in astrociti esposti a LPS e INF- $\gamma$  indotti da stress nitrosativo (146). È importante notare che l'L-carnosina determina la nitratura della tirosina nelle alterazioni proteiche dipendenti dal perossinitrito. (147). Dati recenti dimostrano che l'L-carnosina previene l'up-regolazione dell'iNOS e l'induzione sia dell'HO-1 che dell'Hsp-70 in seguito al danno nitrosativo (146). Inoltre c'è una correlazione tra protezione cellulare e l'attività di scavenging della D-carnosina verso i radicali liberi dell'NO (ossido nitrico) che dimostra, in esperimenti in vitro con cellule, la diretta abilità ad intrappolare NO (148). Comunque, l'L-carnosina può essere considerata un importante attivatore delle risposte delle heat shock, superando il suo classico ruolo di composto protettivo multi target.

Recentemente L-carnosina è stata definita il composto nutriente della longevità, in quanto studi sperimentali indicano che essa può ritardare la senescenza e provocare il ringiovanimento cellulare in culture di fibroblasti umani. La carnosina è stata definita il dipeptide antiaging e anti-ossidante (149). È noto che L-carnosina è idrolizzata rapidamente nel siero umano da uno specifico enzima idrolitico (carnosinasi) (150, 151) limitando così i suoi effetti terapeutici (152). Tale problema, nel siero umano, può essere superato utilizzando un derivato stabile dell'L-carnosina (153-155). Nel caso specifico, la D-carnosina, un isomero non naturale resistente all'idrolisi della carnosinasi ed esistente in forma stabile nel plasma, è capace di attraversare la barriera del liquido cerebrale, provvedendo quindi ad un intervento sistemico nelle malattie correlate allo stress ossidativo (156).

## SCOPO DELLA RICERCA

In condizioni normali, nella cellula operano sistemi di difesa antiossidante molto efficienti, c'è un equilibrio tra proossidanti ed antiossidanti necessario per il mantenimento di un sistema di difesa antiossidante che, durante il normale metabolismo cellulare, è in grado di eliminare tutti i radicali liberi che si generano (7). Numerosi dati sperimentali evidenziano il coinvolgimento dello stress ossidativo nel meccanismo dell'invecchiamento e delle neurodegenerazioni (19).

Negli ultimi anni, da quando lo stress ossidativo è stato ritenuto alla base di alcuni, aspetti della neurodegenerazione, sono state condotte numerose ricerche sperimentali allo scopo di ridurre gli effetti dello stress ossidativo attraverso l'utilizzo degli scavengers dei radicali liberi (32).

Da un punto di vista molecolare, nel sistema nervoso centrale (SNC), le cellule sono in grado di combattere lo stress ossidativo con molte risorse, tra cui le molecole bioattive (glutathione, tioredoxina, flavonoidi), l'acido lipoico, enzimi (proteine dello shock termico, superossido dismutasi, catalasi, glutathione perossidasi, tioredoxina reduttasi, ecc) e fattori trascrizionali di proteine redox sensibili. (64). Le proteine heat shock (HSP) sono uno dei sistemi di difesa più studiati attivi contro il danno cellulare. Le "heat shock response" contribuiscono ad instaurare uno stato citoprotettivo in un'ampia varietà di patologie umane, come l'infiammazione, il cancro, l'invecchiamento ed i disordini neurodegenerativi. La famiglia dei vitageni, composta dalle "heat shock proteins" HO-1, Hsp70, dal sistema della tioredoxina e dalle sirtuine (64), ha aperto nuove prospettive in medicina e farmacologia, per cui molecole capaci di attivare questi meccanismi di difesa appaiono possibili candidati per nuove strategie citoprotettive (157-161).

Gli obiettivi della presente ricerca sono i seguenti:

### **1. Invecchiamento:**

- dosare i livelli di espressione delle proteine dello stress, mediante analisi Western blot, in aree cerebrali di ratti invecchiati, utilizzando anticorpi specifici: Hsp-90, Hsp-70, HO-1, Trx, TrxR, CN1, 4-HNE, DPNH.

- investigare il ruolo svolto dai radicali liberi nei processi di invecchiamento, attraverso un approccio di redox proteomica

-analizzare l'ossidazione di specifiche proteine, attraverso la misura dei livelli di proteine carbonilate, in quattro diverse regioni cerebrali di ratti (ippocampo, cervelletto, corteccia e striato) di 28 mesi (senescenti) e di 12 mesi (adulti).

-identificare le proteine che sono specificatamente ossidate durante i processi di invecchiamento nelle diverse regioni cerebrali, in quanto molte di queste proteine sono correlate alla funzionalità dei mitocondri, al metabolismo energetico e con attività di chaperoni.

### **2. Sclerosi multipla**

Esistono evidenze sperimentali che indicano che la MS è una malattia multifattoriale, che origina dall'interazione di fattori genetici e ambientali e si conosce ancora poco sulle causa e sui fattori che contribuiscono al suo decorso (8). È stato ipotizzato che il sistema redox e quindi il bilancio redox ossidante/antiossidante è implicato nella patogenesi della MS (13).

L'obiettivo della presente ricerca sarà quello di valutare la risposta sistemica allo stress cellulare e lo stress ossidativo associato per dimostrare la presenza di markers ossidativi nel plasma, nei linfociti e nel liquor di pazienti affetti da sclerosi multipla di tipo RR in fase di attività, comparandoli con soggetti sani omogenei per età, per ottenere un quadro dei meccanismi molecolari che regolano la risposta allo stress cellulare durante la progressione della malattia e per tracciare un percorso nella ricerca di

sostanze che possano promuovere la neuroprotezione, modificando la storia naturale della malattia.

La ricerca prevede i seguenti obiettivi:

-dosare il livello delle Hsp-72, e dell'HO-1 e delle SIRT nel plasma e nei linfociti di soggetti controllo e di soggetti affetti da MS, mediante analisi Western blot.

-studiare, attraverso un approccio di redox proteomica il ruolo svolto dai radicali liberi nella Sclerosi Multipla.

-analizzare l'ossidazione di specifiche proteine, attraverso la misura dei livelli di proteine carbonilate nel siero di pazienti affetti da Sclerosi Multipla ed in soggetti controllo.

### **3 Antiossidanti e neuroblastoma**

Per capire i possibili meccanismi alla base dell'azione protettiva di molecole ad attività antiossidante tra cui l'HBB-2 nel Sistema Nervoso Centrale, verrà studiato, in vitro, il ruolo citoprotettivo dell'HBB-2 nei confronti degli insulti infiammatori ed ossidativi, mediati dal SIN-1, generatore di perossinitrito (NO) ed in cellule umane di neuroblastoma (SH-SY5Y).

Per verificare gli effetti citoprotettivi dell'HBB-2 saranno condotti studi in vitro in cellule umane di neuroblastoma (SH-SY5Y) per:

- esaminare, l'effetto neuroprotettivo della L-acetilcarnitina in cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y esposte a stress ossidativo indotto dall'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- valutare i livelli di espressione dell'Hsp-70 e dell'HO-1, come markers di stress ossidativo, e la vitalità cellulare per indagare gli effetti citoprotettivi dell'L-acetil-carnitina, in cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y esposte a stress ossidativo in assenza e presenza di L-acetil-carnitina

- valutare i livelli delle stress protein nel neuroblastoma umano sottoposto a stress nitro sativo dopo trattamento con HBB-2.

#### **4. Lesione al midollo spinale e Carnosina**

L'importanza della mediazione dei radicali liberi nel danno cellulare nella SCI (lesione al midollo spinale) è sostenuta da un ampio numero di studi sperimentali e clinici che dimostrano l'efficacia degli agenti antiossidanti nel migliorare il danno neuronale (106,119,141,142).

Sebbene l'esatto ruolo biologico non è ancora conosciuto, numerosi studi hanno dimostrato che, sia a livello dei tessuti che degli organelli cellulari, l'L-Carnosina ha proprietà antiossidanti, in quanto previene e riduce l'accumulo di sostanze ossidate derivate dalla perossidazione lipidica ed ha una stupefacente azione anti-aging (143). Scopo della presente ricerca è stato quello di studiare, l'efficacia della L-carnosina e della D- carnosina in modelli di animali con lesione al midollo spinale (SCI).

L'obiettivo è stato quello di determinare i livelli di espressione dei markers di stress ossidativo dell'Hsp-70 in topi con SCI in assenza e presenza di L-carnosina e D-carnosina rispetto ai topi controllo.



## MATERIALI E METODI

### 1. Ratti ed invecchiamento

#### *Animali*

Sono stati utilizzati 8 ratti Wistar maschi (Harlan-Sprague-Dawley, Indianapolis, IN, USA), del peso di 150-180 gr. Gli animali sono stati tenuti due per gabbia in condizioni standard (luce dalle 7:00 am alle 7:00 pm) con cibo ed acqua a continua disposizione. Dopo la decapitazione i cervelli sono stati rapidamente rimossi e le seguenti aree sono state dissezionate: corteccia, sostanza nera, setto, striato, ippocampo e cervelletto. La dissezione è stata eseguita in accordo con le procedure standardizzate, in una camera anatomica a freddo e seguendo un protocollo che necessita un massimo di 50 secondi per ogni esemplare. Gli animali sono stati usati solo quando strettamente necessario ed adeguate misure sono state adottate per minimizzare la sofferenza non necessaria agli animali in accordo con il Consiglio direttivo delle comunità europee del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC).

#### *Trattamento dei campioni*

I campioni, dopo estrazione, sono stati omogenati in ghiaccio, per 10s, in 100mM di fosfato di potassio, pH 7.5, per la determinazione delle stress proteins mediante analisi Western blot e per il dosaggio del glutatione ridotto e ossidato, mentre per misurare l'attività enzimatica della carnosinasi, in Tris-HCl pH 8.0. I campioni sono stati quindi centrifugati per 10 min. a 10.000 g. Il sovrinatante è stato utilizzato per la determinazione delle stress proteins; la

concentrazione delle proteine è stata dosata con il metodo al BCA (Pierce, Rockford, IL).

Per l'analisi proteomica i campioni di tessuto cerebrale di ippocampo, cervelletto, striato e di corteccia cerebrale sono state omogenate e risospesi in 10 mM HEPES tampone (pH 7,4) contenente 137 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mM, 0,1 mM EDTA, e 0.6 mM MgSO<sub>4</sub> così come gli inibitori della proteasi: leupeptina (0,5 mg/ml), (0,7 pepstatina µg/mL), di tipo II S inibitori della tripsina di soia (0,5 µg/mL), e PMSF (40 µg/mL). Questo è stato poi centrifugato a 14000 g per 10 min. per rimuovere i detriti cellulari e sul sovrinatante è stata effettuata la determinazione delle proteine con il reattivo di Coomassie Plus Protein Assay (Pierce Rockford, IL, USA).

## **2. Sclerosi Multipla**

### ***Permesso Etico***

Tutte le procedure sui soggetti umani sono state condotte in accordo con le linee guide della dichiarazione di Helsinki e i protocolli sperimentali sono stati formalmente approvati dal comitato etico dell'Università degli studi di Catania.

### ***Pazienti con MS***

Sono stati esaminati 26 pazienti di una fascia di  $32 \pm 9.5$  anni con un intervallo di età di 20-60 anni. In tutti questi pazienti è stata confermata la diagnosi di MS in accordo con il criterio diagnostico di Mc Donald et al. (162). e sono stati classificati clinicamente con una forma di MS remittente-recidivante in accordo con i criteri descritti da Lublin e Reingold (163). I pazienti non hanno subito trattamenti con immunosoppressori o con corticosteroidi da almeno due mesi prima del prelievo e nessun paziente ha preso  $\beta$ -interferone.

### ***Soggetti Controllo***

Il gruppo controllo era formato da 20 soggetti sani con un range di età di 30-60 anni i quali sono stati sottoposti a puntura lombare per il sospetto, poi non confermato, di emorragia subaracnoideale, pseudotumore cerebrale, paralisi oculomotoria o per altre indicazioni che richiedono tale esame.

### ***Estrazione del Plasma***

Il sangue è stato raccolto dai soggetti controllo e dai pazienti da un prelievo venoso dalla vena cubitale anteriore in tubi contenenti 500 mM di EDTA come anticoagulante. Subito dopo il prelievo il sangue è stato centrifugato a 10.000g per 1 min. a 4°C per separare il plasma dalla parte figurata.

### ***Estrazione del siero***

Il sangue è stato raccolto dai soggetti controllo e dai pazienti con prelievo venoso dalla vena cubitale anteriore in tubi contenenti 500 mM di EDTA come anticoagulante. Subito dopo il prelievo il sangue è stato centrifugato a 10.000 g per 3 min. a 4°C per separare il siero dalla parte figurata.

### ***Purificazione dei linfociti***

Il metodo è basato sull'uso del Ficoll Paque (Pharmacia biotech). Boyum ha utilizzato per primo il Ficoll grazie alla sua bassa viscosità rispetto ad altri agenti aggreganti gli eritrociti (164). Il metodo è semplice e rapido. Ad una soluzione (3 ml) di diatrizzato di sodio sono stati aggiunti 4 ml di sangue diluito 1:1 con una soluzione salina bilanciata e dopo si è centrifugato a 400 g per 30 min a 20°C. E' stato recuperato l'anello linfocitario che si è formato e si sono fatti due lavaggi con la soluzione salina bilanciata (6 ml)

centrifugando altre 3 volte a 100 g a 20°C fino ad ottenere il pellet linfocitario finale.

### **3. Antiossidanti e neuroblastoma**

#### ***Culture cellulari***

Sono state utilizzate cellule umane di neuroblastoma (SH-SY5Y, CRL-2266, American Type Culture Collection Rockville, Md, USA).

SH-SY5Y è una ben definita linea cellulare derivante dalla biopsia di midollo osseo di un paziente con neuroblastoma. La linea cellulare parentale comprende almeno due fenotipi morfologicamente differenti, neuroblastico (N-tipo) ed il suo substrato aderente (S-tipo) che possono essere sottoposti a trans-differenziazione (**165**). Le cellule SH-SY5Y possono differenziarsi in cellule con morfologia neuronale, il cui fenotipo dipende dall'esposizione a vari agenti inducibili (**166,167**). Le cellule SH-SY5Y sono state coltivate in 50% di DMEM (cod M5650) contenente 2mM di L-glutamina, penicillina (100µg/ml) e streptomicina (0.1 mg/ml) supplementato con 10% di siero fetale bovino(FBS-10%) e 50% di Nutrient F-12 HAM (cod. N6658). Le cellule sono state coltivate in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> e mantenute a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>.

Le cellule confluenti sono state quindi esposte a esposte a trattamento come da tabelle sottostanti.

Dopo i vari trattamenti le cellule sono state lavate 3 volte con PBS (pH 7.4), screpate e pellettate. Il pellet cellulare è stato risospeso in 0,32 M di sucrosio, 1 mM di EDTA, 10 mM di Tris (pH 7.4), 0,5 mM di fenil-metil-sulfonilfluoride (PMSF) ed omogeneizzato prima dell'analisi mediante *Western blot*. La frazione proteica citosolica (50 µg) dei campioni omogenati, ottenuta dopo centrifugazione a 10.000 rpm per 5 min. a 4°C, è stata utilizzata

per la determinazione dei livelli di espressione delle heat shock proteins mediante Western blots

Per il saggio di vitalità cellulare le cellule sono state piastrate su multiwell da 96 pozzetti ed esposte a trattamento come in tabella 1 e 2.

TRATTAMENTI	TEMPO
CTRL	6h e 24h
HBB-2 (2µM)	6h e 24h
HBB-2 (5µM)	6h e 24h
HBB-2 (10µM)	6h e 24h
HBB-2 (20µM)	6h e 24h
SIN-1 (1 mM)	7h
HBB-2 (2µM)+SIN-1 (1 mM)	6h(+7) e24h (+7)
HBB-2 (5µM)+SIN-1 (1 mM)	6h(+7h) e24h (+7h)
HBB-2 (10µM)+SIN-1 (1 mM)	6h (+7h) e 24h(+7h)
HBB-2 (10µM)+SIN-1 (1 mM)	6h(+7h) e24h (+7h)

TRATTAMENTI	TEMPO
CTRL	6h e 12h
LAC (20µM)	6h e 12h
LAC (50µM)	6h e 12h
LAC (100µM)	6h e 12h
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2mM)	-1h
LAC (20µM)+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2mM)	6h (-1h) e 12h(-1h)
LAC (50µM)+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2mM)	6h (-1h) e 12h(-1h)
LAC (100µM)+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2mM)	6h (-1h) e 12h(-1h)

#### **4. Carnosina e lesione al midollo spinale**

##### ***Animali***

Topi maschi adulti CD1 (25-30 g, Harlan Nossan, Milano, Italia) sono stati sistemati in un ambiente controllato ed alimentati con cibo standard per roditori e acqua. La cura degli animali è avvenuta in conformità alle regole italiane sulla protezione degli animali usati per esperimenti ed altri scopi scientifici (D.M. 116192) come pure con le regole EEC (O-J-di E.C. 358/12/18/1986).

##### ***SCI***

I topi sono stati anestetizzati con cloro idrato (400 mg/kg peso corporeo). È stata effettuata un'incisione longitudinale sulla colonna vertebrale esponendo il muscolo paravertebrale.

Questo muscolo è stato sezionato di continuo esponendo le vertebre T5–T8. La colonna vertebrale è stata sottoposta a laminectomia attraverso 4 livelli T5-T8 e il danno al midollo spinale è stato prodotto con compressione extra durale a livello T6-T7 utilizzando un taglio con un chiusura di 24 g., successivamente, sono state somministrate per via sottocutanea 1 cc di soluzione fisiologica con lo scopo di rimpiazzare il volume di sangue perduto durante l'operazione. Durante il recupero dall'anestesia, i topi sono stati collocati in un ambiente riscaldato e sono stati coperti con un'asciugamano calda. I topi sono stati semplicemente sistemati ad una temperatura ambiente controllata di 27°C per un periodo di sopravvivenza di 10 giorni. Cibo e acqua è stato fornito ai topi. Durante questo periodo di tempo, le vesciche degli animali sono state svuotate manualmente due volte al giorno finché il topo non è stato capace di riprendere le normali funzioni della vescica. In tutti i gruppi di topi trattati, il midollo spinale è stato compresso per 1 minuto. Gli animali sham sono stati soggetti solo a laminectomia.

### ***Disegno Sperimentale***

I topi sono stati collocati casualmente all'interno dei gruppi seguenti:

**(i)** SCI+gruppo veicolo. I topi sono stati sottoposti a una maggior somministrazione di soluzione salina (somministrata i.p., 1h e 6h dopo SCI) (N=10);

**(ii)** Gruppo D-carnosina. Lo stesso come il gruppo SCI+veicolo in cui è stato somministrato i.p. D-carnosina (150 mg/kg), 1h e 6h ore dopo il SCI (N=10).

**(iii)** Gruppo L-carnosina. Lo stesso del gruppo SCI+veicolo in cui è stato somministrato i.p. L-carnosina (150 mg/kg), 1h e 6h ore dopo il SCI. SCI+veicolo nei quali è stato somministrato i.p. D-carnosina (150 mg/kg), 1h e 6h ore dopo il SCI (N=10).

Dopo i trattamenti i topi (N=10 per ciascun gruppo per ciascun parametro) sono stati sacrificati 24h dopo la lesione al midollo spinale in ordine a procedere con differenti analisi e parametri di valutazione.

In una separata serie di esperimenti altri 10 animali per ciascun numero sono stati osservati fino a 10 giorni dopo il danno al midollo spinale per valutare il motor score.

Nell'altra serie di esperimenti altri 10 animali per ciascun gruppo sono stati osservati per valutare la curva dose-effetto.

### ***Preparazione campioni***

Il tessuto è stato omogeneizzato e centrifugato a 10,000 g per 10 minuti e il surnatante, è stato utilizzato per il dosaggio delle proteine e la determinazione dei livelli di espressione delle Hsp-70 mediante analisi Western Blots.

### ***Dosaggio delle proteine***

La concentrazione delle proteine è stata dosata utilizzando il metodo dell'acido bicinconinico (BCA) (Cod 23227 Pierce Protein Research Products, Rockford, IL 61101 U.S.A.) secondo il metodo descritto in Smith et al. (168) e impiegando siero albumina bovina come standard.

Questo saggio consente di determinare la concentrazione di un campione incognito di proteina (mg/ml), oppure può essere utilizzato per determinare la quantità totale di proteina in un campione proteico incognito (mg). Il saggio BCA ha un range di concentrazione lineare tra 200-1000 µg di proteina per millilitro.

Il metodo si basa sulla formazione di un complesso proteina-Cu<sup>2+</sup> in condizioni alcaline, seguito dalla riduzione del Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup>. La cisteina, la cistina, il triptofano, la tirosina ed il legame peptidico sono in grado di ridurre lo ione rameico a rameoso. L'acido bicinconinico forma un complesso blu-porpora con il Cu<sup>+</sup> in ambiente alcalino, fornendo una base per monitorare la riduzione del Cu<sup>2+</sup> da parte delle proteine. Il saggio viene normalmente effettuato a 37°C, in quanto l'aumento della temperatura favorisce lo sviluppo del colore.

Viene misurata l'assorbanza a 562 nm, e la concentrazione della proteina è determinata per confronto con una curva standard.

### ***Analisi Western Blot***

I livelli delle stress proteins sono stati valutati mediante l'analisi Western blot nelle cellule di neuroblastoma umano e nel midollo spinale.

Concentrazioni uguali di proteine estratte per ogni campione (50 µg) sono state separate su un mini gel precasting di poliacrilammide al 4-20% (cod NB10420 NuSept Ltd Australia). Prima di essere caricati sul gel, i



campioni sono stati bolliti per 3 minuti in sample buffer (contenente 40 mM di Tris-HCl pH 7.4, 2,5% di SDS, 5% di 2-mercaptoetanololo, 5% di glicerolo, 0.025 mg/ml di blu di bromo fenolo). Le proteine sono state trasferite sulla membrana di nitrocellulosa (0.45 $\mu$ M) (BIO-RAD Hercules, CA, USA) in un buffer di trasferimento contenente (0.05% di SDS, 25mM di Tris, 192mM di glicina e 20% v/v di metanolo).

Il trasferimento delle proteine sulla membrana di nitrocellulosa è stato confermato mediante colorazione con Rosso Ponceau, che è stato poi eliminato con 3 lavaggi in PBS (buffer fosfato salino) di 5 min. ciascuno. Le membrane sono state quindi incubate per 1 ora a temperatura ambiente in 20 mM di Tris pH 7.4, 150 mM di NaCl e Tween 20 (TBS-T) contenente latte in polvere al 3% e incubate per tutta la notte con l'anticorpo primario a 4°C in TBS-T contenente latte in polvere all'1%.

Le membrane sono state incubate con gli anticorpi primari appropriati overnight a 4°C in TBS-T .

Gli anticorpi in eccesso non legati sono stati rimossi mediante 3 lavaggi con TBS-T per 5 minuti. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, le membrane sono state lavate 3 volte per 5 min. in TBS-T e poi incubate per 1 h a temperatura ambiente con l'anticorpo policlonale secondario coniugato con la perossidasi di rafano (diluizione 1:2000).

- Le membrane sono state quindi lavate 3 volte con TBS-T per 5 minuti. La stessa membrana è stata incubata con un anticorpo policlonale anti-beta-actina (SC 1615 Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA, diluizione 1:1000) per verificare che la concentrazione delle proteine caricate nel gel fosse la stessa in ogni campione. Infine le membrane sono state incubate per 3 minuti con il SuperSignal chemiluminescence detection kit system (Cod 34080 Pierce Chemical Co, Rockford, USA) per visualizzare le bande specifiche delle proteine per ciascun anticorpo. Le bande immunoreattive sono state quantificate mediante l'acquisizione del segnale luminescente emesso dalle

membrane con il Gel Logic 2200 PRO (Bioscience) ed analizzate con il software Molecular Imaging per l'analisi completa delle regioni d'interesse per la misura di rapporti di espressione. Il peso molecolare delle proteine analizzate è stato determinato usando una curva standard preparata con proteine di peso molecolare

### **Dosaggio del glutatione ridotto ed ossidato**

Il glutatione ridotto (GSH) e quello ossidato (GSSG) sono stati dosati con il metodo della GSSG riduttasi NADPH dipendente come descritto in Adams et al. (169). Per il dosaggio del glutatione totale (GSH+GSSG) sono state prese delle aliquote di 0.1 ml di omogenato delle diverse aree cerebrali e sono state aggiunte a 0.1 ml di una soluzione fredda contenente 10 mM di DTNB e 5 mM di EDTA in 10 mM di fosfato di potassio a pH 7.5. Il campione è stato miscelato per agitazione e centrifugato a 12.000 g per 2 min. a 4°C. Una aliquota di 50 µl del sovrinatante è stata aggiunta ad una cuvetta contenente 0.5 U di GSSG riduttasi in 100mM di fosfato di potassio e 5 mM di EDTA a pH 7.5 (buffer 1). Dopo avere fatto passare 1 min. per equilibrare il tutto, la reazione è stata fatta partire con l'aggiunta di 220 nmol. di NADPH in buffer 1 per un volume finale di reazione di 1 ml. La formazione del coniugato GSH-DTNB è stata quindi misurata ad una lunghezza d'onda di 412 nm. La cuvetta di riferimento conteneva concentrazioni uguali di DTNB, NADPH ed enzima ma non conteneva campione. Per il dosaggio del GSSG, un'aliquota di 0.5 ml di campione è stata aggiunta rapidamente a 0.5 ml di una soluzione contenente 10 mM di NEM e 5 mM di EDTA in 100 mM di fosfato di potassio a pH 7.5. Il tutto è stato miscelato per agitazione e centrifugato a 12.000 g per 2 min. a 4°C. Dopo è stata prelevata una aliquota di 0.5 ml di sovrinatante che è stata fatta passare in una colonnina C18 SEP-PAK della Waters (Waters, Framingham, MA) che è stata prima attivata aggiungendo in successione 1 ml di metanolo e 1 ml di acqua. La colonna è stata quindi lavata con 0.1 ml buffer 1. Una aliquota di 0.865 ml di questo

eluato è stata aggiunta in cuvetta con 250 nmol. di DTNB e 0.5 U di GSSG riduttasi. Il dosaggio è stato effettuato come misura del GSH totale. Il glutatione ridotto è stato ottenuto sottraendo quello ossidato dal totale. Sono stati aggiunte quantità note di GSH e GSSG al campione controllo in un range di 0-10 nmol. e 0.010-10 nmol. rispettivamente per ottenere le curve standard. I risultati sono stati espressi come nmol. di GSH o GSSG per mg di proteine.

### **Dosaggio dei gruppi sulfidrilici (SH) liberi e legati a proteine**

Nelle differenti aree cerebrali sono stati stimati, immediatamente dopo il sacrificio, i gruppi sulfidrilici proteici e non proteici, secondo il metodo di Sedlak e Lindsay (170). I tests sono stati effettuati in vivo utilizzando acetaldeide e GSH standards, ed hanno permesso di rilevare che l'acetaldeide, secondo un range di 15-70 $\mu$ M, non interferisce con il dosaggio dei gruppi sulfidrilici. Il quantitativo dei gruppi solfidrici è stato espresso in nmol per mg di proteine.

### **Dosaggio della Carnosinasi**

I campioni sono stati incubati con carnosina (10 mM) in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 per 2h at 37°C. La reazione è stata bloccata dall'aggiunta di 10 $\mu$ l di 0.5N TCA. Dopo centrifugazione (15,000 g per 5 min), il prodotto finale è stato usato per testare il contenuto di istidina derivante dall'attività della carnosinasi usando il metodo spettro fluorimetrico (171), adattato a piastre di 96 pozzetti. Brevemente, i campioni deproteinizzati (60  $\mu$ l) sono stati aggiunti ai seguenti reagenti: 90  $\mu$ l of 2M NaOH e 90  $\mu$ l di 0.05% mM o-phthaldialdehyde (OPA). Successivamente i campioni sono stati incubati a 37°C per 15 min tramite aggiunta di 90  $\mu$ l di 4M  $H_3PO_4$ . Dopo 15 min la

soluzione è stata tenuta a temperatura ambiente per 30 min., quindi è stata misurata la fluorescenza ( $\lambda_{exc}$ : 340 nm and  $\lambda_{em}$ : 450 nm), con spettrofotometro (Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer) dotato di Microplate reader (Varian).

### **Saggio di vitalità cellulare (MTT)**

La vitalità cellulare è stata determinata mediante analisi MTT: bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (Cod. M2128 Sigma).

Il test dell'MTT è un saggio di citotossicità colorimetrico che permette di testare la proliferazione e la vitalità cellulare ed in particolare l'efficienza mitocondriale. L'MTT è un sale di tetrazolio che nel caso di cellule vitali viene ridotto dall'ambiente altamente riducente delle cellule proliferanti per azione della deidrogenasi mitocondriale. La riduzione dell'MTT determina la formazione di cristalli di formazano che attribuiscono una caratteristica colorazione violacea ai mitocondri delle cellule vitali. Al contrario in cellule non proliferanti o morte, aventi quindi mitocondri non attivi, l'MTT non verrà ridotto con una conseguente colorazione violacea meno intensa (172). La procedura del test di vitalità cellulare prevede che in ogni pozzetto siano depositati 10  $\mu$ l di una soluzione di MTT 0.5 mg/ml e il tutto venga incubato per 3 ore (il tempo d'incubazione non deve superare le 4 ore dato che l'MTT è citotossico) a 37°C con un'atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5% e satura di umidità.

Scaduto il tempo di incubazione, viene eliminata la soluzione di MTT e vengono aggiunti 120  $\mu$ l di isopropanolo acido per sciogliere i cristalli di formazano formati. L'intensità della colorazione della soluzione ottenuta è direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano ed è quindi espressione della vitalità cellulare. La densità ottica (OD) è misurata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 570 nm. Il grado di

vitalità cellulare e quindi il grado di tossicità del composto testato è esprimibile con la seguente formula:

$$\% \text{ vitalità cellulare} = \left[ \frac{\text{OD (570 nm) composto testato}}{\text{OD (570 nm) controllo negativo}} \right] \times 100$$

La vitalità cellulare viene calcolata misurando la differenza in termini di densità ottica tra i campioni trattati rispetto ai controlli.

### ***Analisi proteomica e redox proteomica delle proteine ossidate***

Per capire come lo stress ossidativo possa contribuire ai processi neurodegenerativi è necessario avere una visione complessiva delle modificazioni ossidative che interessano le proteine cellulari. Un valido aiuto in questa indagine è dato dall'utilizzo delle recenti tecniche di analisi proteomica e redox-proteomica.

L'analisi proteomica si basa sulla possibilità di frazionare le miscele proteiche mediante elettroforesi mono e/o bidimensionale (2-DE) su gel di poliacrilamide e sulla successiva identificazione delle bande proteiche di interesse mediante tecniche di spettrometria di massa.

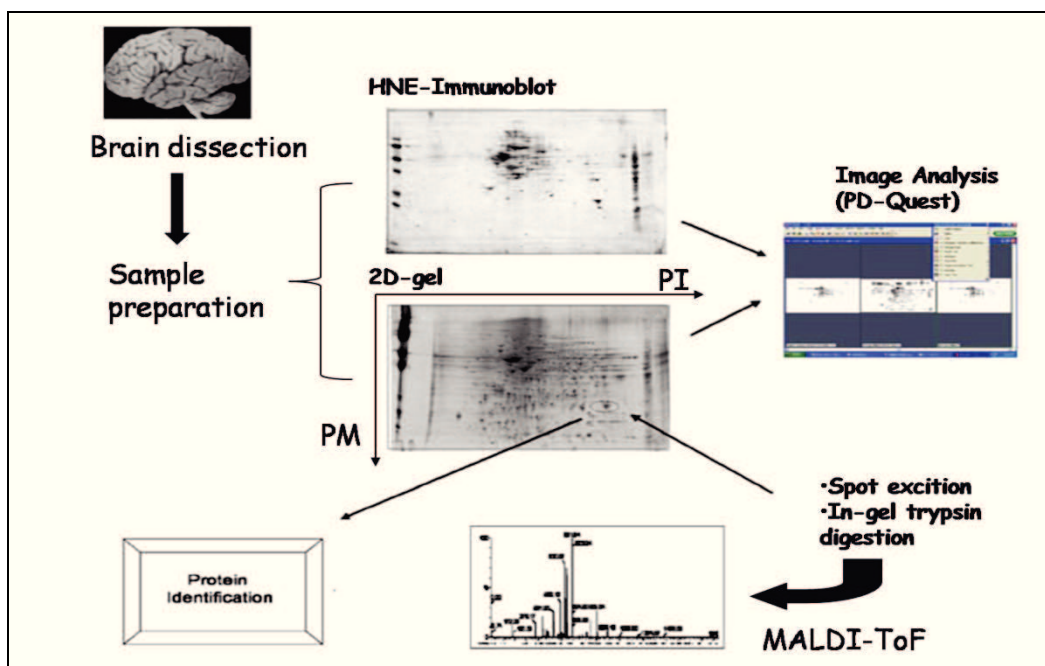
La 2-DE risulta essere una procedura ottimale per l'analisi globale di proteine in quanto si è dimostrata in grado di separare, quantificare ed identificare migliaia di proteine presenti in un singolo gel. Nell'elettroforesi bidimensionale (vedi immagine sottostante) la prima dimensione consiste in un isoelettrofocusing in condizioni denaturanti (separazione in base al punto isoelettrico); la seconda dimensione è un'elettroforesi in SDS (separazione in base al peso molecolare). Dopo adeguata colorazione, le immagini dei gel bidimensionali (almeno 6 campioni per ogni gruppo di studio) vengono acquisite tramite un densitometro e quindi analizzate con il PDQuest 2-D Analysis (Bio-Rad), un complesso e sofisticato software che permette una valida analisi comparativa e consente l'analisi simultanea di gel ottenuti nelle medesime condizioni sperimentali.



### **-Esempio di elettroforesi bidimensionale**

L'intensità di ogni singola macchia presente sui gel viene confrontata all'interno di ogni singolo gruppo usando una appropriata analisi statistica. Solo le proteine che differiscono significativamente da quelle dei corrispondenti controlli mediante analisi del T-test di Student vengono selezionate per l'identificazione. A tale scopo le macchie vengono tagliate e digerite sul gel con tripsina. I peptidi risultanti vengono quindi estratti e sottoposti all'analisi con spettrometria di massa MALDI-TOF. L'inserimento degli spettri MALDI ottenuti dai frammenti triptici all'interno di un database disponibile online ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) permette l'identificazione delle proteine di interesse.

L'identificazione delle modificazioni ossidative a carico delle proteine indotte da condizioni di stress ossidativo può essere effettuata mediante la redox proteomica, che permette di identificare le proteine carbonilate, legate all'HNE e nitrosilate. Questa tecnica accoppia l'elettroforesi bidimensionale con metodi immunochimici per la rivelazione delle proteine ossidate (vedi immagine sottostante).



**-Protocollo per l'identificazione delle proteine ossidate tramite l'analisi redox proteomica.**

L'immunoblot (Western blot) si ottiene mediante l'utilizzo di specifici anticorpi diretti contro il dinitrofenilidrazone (proteine carbonilate), o la 3-NT (proteine nitrosilate) o l'HNE (proteine legate al 4-idrossinonenale). L'analisi comparativa delle mappe proteiche, ottenute sia su gel 2-DE che su membrana (immunoblot) mediante appropriati software per l'analisi statistica, consente l'individuazione delle macchie corrispondenti alle proteine che risultano significativamente ossidate nei campioni sperimentali rispetto ai campioni di controllo. Tali proteine vengono successivamente identificate mediante spettrometria di massa e confronto con banche dati.

### ***Elettroforesi bidimensionale***

I campioni (contenenti 200 µg di proteine) sono stati preparati secondo il metodo di Levine et al. (173). Le proteine sono state precipitate mediante l'aggiunta di TCA (acido tricloracetico) ad una concentrazione finale del 15%. Dopo 10 min in ghiaccio, i pellets sono stati raccolti per centrifugazione a 14.000 g per 2 min e lavati per 3 volte con 0.5 ml di una soluzione di acetato di etile/etanolo (1:1). Dopo il lavaggio, i campioni sono stati risospesi in 185 µl di buffer di reidratazione così composto: urea 8M, ditiotreitolo 20mM, CHAPS 2.0% (w/v), Biolytes 0.2%, tiourea 2 M e blu di bromofenolo.

Per la prima dimensione, 200 µl di campione sono stati caricati lungo le corsie di una vaschetta per l'elettrofocalizzazione, facendo attenzione a distribuirli nel modo più uniforme possibile lungo le singole corsie. Quindi le strip da 17 cm (ReadyStrip IGP Strip 3-10 pH, Biorad) sono state poste nella soluzione campione per 1h, per permettere la reidratazione e l'uptake delle proteine. Il tutto è stato quindi posto nell'apparecchio Protean IEF Cell Apparatus (Bio-Rad) per 16h a 50V. Dopo 1h di corsa sono stati aggiunti 2 ml di olio minerale su ciascuna corsia in modo da evitare l'evaporazione.

Terminata la reidratazione, le strip sono state sottoposte a isoelettrofocusing utilizzando il seguente programma di focalizzazione: 300 V per 2h (slope lento); 500 V per 2 h (slope lento); 1000 V per 2 h (slope lento); 8000 V per 8 h (slope lento); 8000 V per 10 h (slope veloce). I campioni, così trattati, sono stati separati in base al punto isoelettrico. Tutti i procedimenti sono stati condotti a temperatura ambiente.

Per la seconda dimensione, le strip sono state trattate per 10 min nel tampone di equilibratura contenente: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, urea 6M, SDS 1% (w/v), glicerolo 30% (v/v) e ditiotreitolo 0.5%, e successivamente riequilibrate per 15 min nello stesso tampone contenente la iodoacetammide 4.5% al posto del ditiotreitolo. Poi ciascuna strip è stata posta sulla sommità di un gel precast Linear Gradient (8-16%) e 12% Precast criterion XT



(Biorad) e sigillata con agarosio. La corsa è stata condotta a 200 V per 65 min utilizzando come standard una soluzione Precision Protein™ della Biorad. I campioni, così trattati, sono stati separati in base al peso molecolare.

Effettuata la seconda dimensione i gel sono stati quindi incubati nella soluzione di fissaggio (7% ac. acetico, 10% metanolo) per 20 min e colorati con circa 40 ml di Bio-Safe Coomassie gel Stain (Bio-rad) per 1h in moderata agitazione. Infine i gel sono stati tenuti una notte in acqua deionizzata per eliminare il colorante.

### **Redox Proteomica**

Per effettuare la derivatizzazione delle proteine carbonilate i campioni sono stati incubati con quattro volumi di (DNPH) 10 mM in HCl e sottoposte ad elettroforesi bidimensionale. Le proteine (200 µg) sono state incubate con 4 volumi di 20 mM di 2,4 dinitrofenilidrazina a temperatura ambiente (25°C) per 20 min.

I gel sono stati preparati allo stesso modo come per l'elettroforesi bidimensionale.

Le proteine del gel della seconda dimensione sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa utilizzando l'apparato "criterion blotter" BIO-RAD; la corsa è stata condotta a 150 V per 2h. La membrana è stata poi incubata con un anticorpo primario rabbit (Chemicon) (1:100) specifico per gli addotti DNP-proteine, seguito da un anticorpo secondario goat anti-rabbit IgG coniugato con la fosfatasi alcalina (Sigma, ST Louis, MO, USA) (1:5000). La membrana è stata poi sviluppata con SIGMA FAST (5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitro blu tetrazolio in TBS).

## **Analisi delle immagini**

8 gel (n= 4 trattati e n = 4 controlli) e 8 membrane di nitrocellulosa sono state sottoposte a scansione usando HP Deskjet H2180 (Hewlett Packard). Mediante l'uso di uno scanner, che riproduce l'intensità, la posizione e la dimensione delle macchie, e la successiva conversione dei dati in formato TIF si ottiene un'informazione numerica utilizzabile dai vari software. L'identificazione di proteine diversamente espresse tra i set di gel provenienti dai diversi esperimenti richiede specifici software di valutazione dell'immagine in grado di discernere tra le macchie e individuare le differenze.

Il software di analisi, che è stato usato per il matching e l'analisi delle spots di proteine dei diversi gel e membrane, è il PDQuest 2D (versione 7.2.0, Bio-Rad). Questo programma consente di eseguire accurate analisi comparative analizzando molti gel o macchie in una volta sola. Il PDQuest 2D comprende una serie di step che possono essere così schematizzati: scanning, individuazione automatica delle spot e trattamento delle immagini, matching tra i gel, normalizzazione e analisi differenziale.

Le immagini dei gel subiscono un primo processamento nel quale il software provvede alla sottrazione del background e delle "righe" verticali e orizzontali e a creare per ogni spot un valore di gaussiana secondo le sue tre coordinate. Ciò è necessario affinché si riescano ad identificare gli spots confusi, rigati o in parte sovrapposti e che non potrebbero essere distinti diversamente. Si creano così 3 immagini: l'originale, la filtrata e l'immagine ricostruita, che nasce dalle gaussiane calcolate per ogni spot: è su questa immagine virtuale che il software lavora in seguito.

A questo punto l'operatore deve indicare lo spot più piccolo, il più flebile e il gruppo di spot più grande nel gel. Purtroppo, l'identificazione

automatica non è mai del tutto esatta e tocca all'operatore aggiungere o rimuovere gli spots identificati in modo non corretto.

Per eseguire il matching tra i gels è necessario scegliere un gel di riferimento (in genere il migliore in cui compaiono più spots). Per procedere alla comparazione tra i gel va indicata al programma una serie di "landmarkers", cioè degli spots comuni tra i gels, che il software utilizzerà come riferimento per allineare e posizionare i gels. Durante il matching il programma crea una immagine di riferimento che consiste in un gel virtuale risultante dalla somma di tutti gli spots provenienti da tutti i gels del match. Questo gel master verrà utilizzato per il confronto tra i diversi matchs.

Quando si confrontano dei gels ci sono spesso delle variazioni che non sono riconducibili ad una differenza di espressione proteica, ma ad es. ad una leggera differenza nella quantità di materiale caricato tra i diversi gels o differenze nell'intensità di colorazione tra un gel e l'altro. Si rivela quindi necessaria una normalizzazione dei gels che si vogliono confrontare. Per normalizzare i valori di intensità che rappresenta la quantità di proteine per spot è stata usata la modalità di sottrazione del fondo.

Dopo aver completato lo spot matching, l'intensità normalizzata di ciascun spot proveniente dai gels o dalle membrane è stata confrontata tra i gruppi usando l'analisi statistica. Il significato statistico è stato valutato mediante il T test di Student, e sono stati considerati significativi i valori di  $P < 0,05$ .

In questo studio la massa molecolare e il punto isoelettrico della maggior parte degli spots sono stati determinati dall'interpolazione tra punti di riferimento caratteristici di ogni immagine.

### ***Digestione con tripsina***

Gli spots proteici selezionati vengono asportati dal gel e trasferiti in eppendorf. Gli spot proteici vengono lavati con bicarbonato di ammonio 0,1

M ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) a temperatura ambiente per 15 min. Ai pezzi di gel viene aggiunto acetonitrile e poi vengono incubati per 15 min a temperatura ambiente. Rimosso il solvente, i pezzi di gel sono essiccati in una cappa a flusso. Gli spots proteici sono incubati con 20  $\mu\text{l}$  di 20 mM di DTT, e con 0.1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a 56°C per 45 minuti. La soluzione DTT è poi rimossa e sostituita con 20 $\mu\text{l}$  di 55mM iodacetamide in 0.1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . La soluzione è poi incubata a temperatura ambiente al buio per 30 min.

La iodacetamide è rimossa e sostituita con 0,2 ml di 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e gli spots vengono nuovamente incubati con acetonitrile (sono stati aggiunte 200  $\mu\text{l}$  di acetonitrile) a temperatura ambiente per 15 min. Dopo 15 min di incubazione, il solvente è rimosso, e gli spots sono essiccati in una cappa a flusso per 30 min. I pezzettini di gel sono poi reidratati con 20 ng/ $\mu\text{l}$  di tripsina metilata (Promega, Madison, WI) in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  con un volume sufficiente a ricoprire completamente i pezzi di gel, incubati a 37°C O.N.

### ***Identificazione delle proteine con spettrometria di massa***

L'identificazione di bande proteiche da 1-D o 2-D gel si ottiene mediante costruzione della mappa peptidica di massa utilizzando essenzialmente la spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted laser Desorption Ionization-Time Of Flight). (vedi figura sovrastante) La banda proteica è escissa dal gel, digerita in situ con opportuni enzimi proteolitici e la miscela peptidica risultante è direttamente analizzata mediante MALDI-MS (174). L'identificazione della proteina viene effettuata utilizzando i valori di massa accurati dei peptidi determinati mediante MALDI-MS. Questi valori, infatti, insieme ad altri parametri quali il tipo di proteasi usata per l'idrolisi o il peso molecolare della proteina presunto dal gel di SDS, vengono introdotti in alcuni programmi di ricerca disponibili in rete (ProFound, MASCOT, MS-

Fit, ecc.). I valori di massa registrati sugli spettri sono paragonati con quelli provenienti dalla digestione teorica di tutte le proteine della banca dati, consentendo l'identificazione della proteina. Questa analisi è stata eseguita in collaborazione con la Dr.ssa Alessandra Giorgi, Dip. Di Scienze Biochimiche dell'università "Sapienza" Roma.

## RISULTATI

### 1. Invecchiamento

#### **Distribuzione regionale dell'attività della carnosinasi e di espressione nel cervello di ratto invecchiato e senescente.**

L'espressione e l'attività della CN1 è stata studiata in differenti aree cerebrali di ratti senescenti ed invecchiati (Fig. 1A and B). Negli animali invecchiati l'espressione della CN1 è tre volte più alta nella sostanza nera (SN) rispetto a tutte le altre aree cerebrali analizzate, che mostrano invece un'espressione paragonabile (Fig. 1A). I ratti senescenti, confrontati con quelli invecchiati, mostrano un significativo aumento ( $p < 0.05$ ) dell'espressione della CN1 in tutte le aree cerebrali tranne nella corteccia. In accordo con l'espressione proteica della CN1, l'attività enzimatica è significativamente più alta in tutte le aree cerebrali dei ratti senescenti confrontati con i ratti invecchiati, una maggiore induzione è stata osservata nella SN, seguita dalla corteccia, setto, ippocampo, cervelletto e striato (Fig. 1B).

#### **Gruppi sulfidrilici totali ed analisi dello stato redox del glutatione**

Le differenti aree cerebrali sono state esaminate per i tioli, per i gruppi totali di SH e per i livelli di GSH, in funzione dell'età; tutte le aree cerebrali ed il cervelletto hanno mostrato un decremento nei gruppi totali di SH (Fig.2) e nei i livelli di GSH (Fig.3A) negli animali senescenti rispetto a quelli invecchiati.

Contrariamente i livelli di glutatione ossidato (GSSG) aumentano nei ratti senescenti rispetto a quelli invecchiati (Fig. 3B). Per confermare l'ipotesi che questi cambiamenti dello stato redox nel cervello invecchiato potrebbero

accendere la “heat-shock response”, è stata quantificata l’espressione dell’Hsp-70 inducibile (hsp-72) e dell’HO-1 nelle differenti aree cerebrali nei ratti senescenti e invecchiati.

### **Distribuzione delle Hsp nell’invecchiamento cerebrale**

Le figure 4A e 5A mostrano che i livelli di espressione delle Hsp72 e dell’HO-1 sono significativamente aumentati in tutte le aree cerebrali dei ratti invecchiati rispetto ai controlli.

Nelle figure 4B e 5B, rispettivamente, sono mostrati nelle analisi Western Blot campioni di ippocampo. In tutte le aree cerebrali esaminate durante l’invecchiamento, è stata osservata una correlazione positiva ( $r = 0.87$ ) tra il decremento dei livelli di GSH e l’incremento di espressione delle Hsp-72.

L’aumento dell’attività della carnosinasi nel cervello può portare ad un decremento dei livelli di carnosina con conseguente decremento del rapporto  $GSH=GSSG$ .

Questo conferma l’ipotesi che lo scambio tiolico redox agisce come segnale per l’induzione di geni citoprotettivi che modulano la tolleranza cellulare allo stress.

### **Livelli di espressione dell’Hsp90, tioredoxina, and tioredoxina reduttasi**

Sono stati analizzati anche i livelli di espressione delle HSp-90, della tioredoxina (Trx) e della tioredoxina reduttasi in aree cerebrali di ratti giovani e invecchiati. I ratti senescenti confrontati con i ratti invecchiati mostrano un significativo aumento dell’Hsp-90 nella corteccia e nell’ippocampo, un aumento nella sostanza nera ma non sono stati trovati cambiamenti significativi nel setto, nello striato e nel cervelletto (Fig. 6A). Questi cambiamenti sono associati con un decremento dell’espressione della proteina

tioredoxina in tutte le aree cerebrali, in particolare nella sostanza nera e nell'ippocampo, tranne nel cervelletto (Fig. 7A).

Coerentemente, i livelli di espressione della tioredoxina riducenti esaminata in tutte le aree cerebrali è risultata elevata nei ratti senescenti rispetto ai ratti invecchiati (Fig. 8A).

Un'analisi Western blot rappresentativa di Hsp90, Trx e TrxR, eseguita in campioni di ippocampo, è mostrato rispettivamente in Figura. 6B, 7B, e 8B

### **Analisi dell'idrossinonenale e protein carbonilate.**

Una quantificazione dello stress ossidativo nel cervello invecchiato è l'ossidazione proteica.

Comunque, nel cervello sottoposto a stress ossidativo si può anche verificare la perossidazione lipidica indotta da HNE. L'HNE formato dall'acido arachidonico o da altri acidi grassi insaturi dopo attacco dei radicali liberi, lega gli addotti di Michael alle proteine, in particolare i residui di cisteina, istidina o lisina. L'analisi dei livelli di HNE nelle differenti aree cerebrali in ratti senescenti ed invecchiati, mostra elevati livelli di HNE legato alle proteine, in tutte le aree cerebrali, tranne nel cervelletto, con alti livelli di GSH trovato in alcune aree (Fig. 9A). Inoltre, è stato trovato, un aumento significativo della quantità totale delle proteine carbonilate ( $p < 0.005$ ) (Fig. 9B), indice di ossidazione proteica (175), in tutte le aree cerebrali esaminate nei ratti senescenti rispetto a quelli invecchiati, ma non nel cervelletto, confermando i dati dell'HNE.

In fig. 9C e D è riportata un'analisi Western blot rappresentativa dell'HNE e delle proteine carbonilate effettuata in campioni di ippocampo.

### **Redox proteomica**

La proteomica consente di determinare quali e quante proteine si esprimono in relazione ad un determinato stimolo, offrendo uno strumento



efficiente per lo screening delle modificazioni delle proteine in diverse condizioni patologiche o per evidenziare i cambiamenti che avvengono nel corso delle varie vie metaboliche (176).

La mappa bidimensionale e la successiva rivelazione immunochimica degli addotti-DNP ha permesso di evidenziare le proteine carbonilate nei campioni di tessuto cerebrale di ratti senescenti rispetto a ratti adulti.

Parallelamente alla determinazione immunochimica dei carbonili, sono stati misurati i livelli di proteine mediante la colorazione con il blu di Coomassie.

L'elettroforesi bidimensionale e la colorazione con il blu di Coomassie consentono di ottenere la mappatura totale delle proteine presenti in un campione e l'immunoblotting con anticorpi anti-DNP permette di individuare specifici addotti-DNP in campioni di ippocampo corrispondenti alle proteine sul gel. Il livello dei gruppi carbonilici per unità di proteina è stato ottenuto dividendo il livello di carbonili di uno spot di proteina posto sulla membrana di nitrocellulosa con il livello del suo corrispondente spot sul gel.

Questi dati esprimono il livello dei carbonili per unità di proteina. La figura 10 mostra l'immagine di un gel 2-D di ippocampo di ratti senescenti (in basso) e di ratti adulti (in alto) dopo colorazione con blu di Coomassie. La Figura 11 mostra un quadro rappresentativo di 2D Western Blot di ratti senescenti (in basso) e ratti adulti (in alto). I ratti adulti rispetto ai ratti senescenti hanno undici proteine significativamente più ossidate. Queste proteine sono: heat shock protein 90 (Hsp90), citocromo b-c1 subunità del complesso 1, creatina chinasi, malato-enolasi, glutammato deidrogenasi, piruvato chinasi,  $\alpha$ -deidrogenasi, fruttosio-bifosfato aldolasi C, subunità  $\alpha$  dell'ATP sintetasi, glutammina sintetasi e diidropirimidinasi legata alla proteina 2. Gli spots corrispondenti a queste proteine sono stati asportati dal gel, digeriti con tripsina e poi analizzati con la tecnica MALDI. I risultati della spettrometria di massa sono stati utilizzati per identificare le proteine

utilizzando il programma Mascot Search Engine e sono riportati nella tabella 1.

Nel cervelletto dei ratti senescenti sono stati trovate 11 proteine significativamente più ossidate rispetto a quelle dei ratti adulti. La figura 12 mostra l'immagine di un gel 2-D di cervelletto di ratti senescenti (in basso) e di ratti adulti (in alto) dopo colorazione con blu di Coomassie. La Figura 13 mostra un quadro rappresentativo di 2D Western Blot di proteine di ratti senescenti e ratti adulti (in alto). La tabella 2 riporta le proteine identificate con la spettrometria di massa, il numero di peptidi corrispondenti al database, la percentuale di copertura, il pI, i valori di PM e l'aumento dei livelli specifici dei gruppi carbonilici indicizzato come percentuale di controllo. Queste proteine sono le Hsc-71, Secernin-1, malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, vesicle-fusing ATPase, pyruvate kinase isozymes M1/M2, synapsin-2, aspartate aminotransferase, phosphoglycerate kinase 1, voltage-dependent anion-selective channel protein, adenylate kinase isoenzyme 4.

Nella corteccia dei ratti senescenti sono stati trovate 14 proteine significativamente più ossidate rispetto a quelle dei ratti adulti. Tali proteine sono mostrate nelle figure 14-15 ed elencate in tabella 3. Tali proteine sono: creatine kinase B-type, serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoforms, aspartate aminotransferase, fructose-bisphosphate aldolase A, peroxiredoxin-2, guanine nucleotide-binding protein subunit beta-1, vacuolar ATP synthase subunit B, Hsp-70, aldehyde dehydrogenase, alpha-actinin, pyruvate kinase isozymes M1/M2, ATP synthase subunit alpha, triosephosphate isomerase. La glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase appare in 2 spot suggerendo che le modificazioni post-traduzionali alterano l'eterogeneità di questa particolare proteina, che interessano il punto isolettico della proteina. Nello striato dei ratti senescenti sono state trovate 9 proteine significativamente più ossidate rispetto a quelle dei ratti adulti. Tali proteine sono mostrate nelle figure 16-17 ed elencate in tabella 4: tubulin

alpha-1A chain, 78 kDa glucose-regulated protein, Hsp-70, adenylate kinase, elongation factor Tu, pyruvate kinase isozymes M1/M2, aconitate hydratase, triosephosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Tutte le proteine, eccetto la pyruvate kinase isozymes M1/M2, sono presenti in singoli spots con valori significativi i per  $P < 0.05$ .

Per verificare i risultati ottenuti mediante l'analisi redox proteomica è stato eseguito uno studio di validazione dell'ossidazione dell'Hsp-70 utilizzando metodi immunochimici tradizionali (Fig. 18). Tali risultati sono coerenti con quelli della proteomica: i livelli di carbonilazione dell'Hsp-70 erano significativamente aumentati di circa il 40% nella corteccia cerebrale dei ratti senescenti rispetto ai ratti adulti. Tale aumento risulta maggiore quando viene rilevato mediante proteomica. Tale differenza è dovuta al fatto che la proteomica misura il livello dei carbonili per unità di proteine, mentre il Western blotting misura il livello dei carbonili delle proteine totali. Chiaramente, entrambe le tecniche hanno dimostrato che l'Hsp-70 è modificata ossidativamente nella corteccia cerebrale dei ratti senescenti.

## **2.Sclerosi multipla**

### **3. Risultati Manuela**

La sclerosi multipla è una malattia cronica infiammatoria demielinizzante del SNC, che nella forma RR si manifesta clinicamente con episodi ricorrenti e reversibili di deficit neurologici a carico di diversi sistemi funzionali, usualmente durante l'età adolescenziale e giovane adulta..

Come si vede in tabella l'età media dell'inizio della patologia era  $31.4 \pm 9.2$  anni con una durata media di malattia di  $3.92 \pm 2.08$  anni. Tale durata di malattia, relativamente breve, è tipica delle forme RR, in cui non si è ancora avuto il viraggio verso la forma secondariamente progressiva. Il valore medio dell'EDSS era di  $1.5 \pm 1.18$  e ciò indica che i pazienti avevano un basso grado

di disabilità legato alla breve durata di malattia. La risonanza magnetica dell'encefalo e della colonna cervicale dimostrava la presenza di diverse lesioni della sostanza bianca dei centri semiovali, iperintense nelle sequenze T2 pesate, ed alcune di queste presentavano enhancement dopo iniezione endovenosa di mezzo di contrasto paramagnetico (gadolinio) che dimostrava che la malattia si trovava in fase di attività al momento dello svolgimento dello studio (Figura 19).

La risposta *heat shock* contribuisce a stabilire uno stato di citoprotezione in una grande varietà di situazioni patologiche, incluse le malattie infiammatorie, neoplastiche, neurodegenerative e l'invecchiamento. La famiglia dei vitageni è composta da diverse Heat shock protein: l'eme-ossigenasi 1 (HO-1, detta anche Hsp32), la Hsp70, il sistema della tioredoxina ed il sistema delle sirtuine (177-179).

In questa ricerca sono stati valutati i livelli di espressione della risposta heat shock dosando le proteine nel liquor, nel plasma e nei linfociti di pazienti affetti da SM e in controlli sani.

L'analisi Western Blot eseguita sul liquor ha evidenziato come nei pazienti SM i livelli di HO-1 siano significativamente più elevati ( $p < 0.05$ ) rispetto ai controlli (figura 20). Questo dato è stato associato agli aumentati livelli di proteine ossidate (figura 21A) e all'aumento della ossidazione lipidica (figura 21C). L'ossidazione delle proteine è stata valutata misurando la quantità delle proteine carbonilate (DNPH). I DNPH possono essere dosati mediante due metodi: derivatizzazione con 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), seguita dalla rivelazione immunochimica con un anticorpo contro l'idrazina proteica; o con la formazione della base di Schiff mediante l'idrazide biotina seguita dalla rilevazione della proteina legata all'imina con l'enzima o fluoroforo legato all'avidina o alla streptavidina. Il metodo di rilevamento basato sul DNPH viene utilizzato di routine per l'individuazione di proteine carbonilate.

In questa ricerca è stato utilizzato il metodo DNPH con la 2,4-dinitrofenilidrazina per la rivelazione dei carbonili proteici. Secondo questa metodica, i campioni vengono derivatizzati con il DNPH, che reagisce con i gruppi carbonili formando 2,4-dinitrofenilidrazone (DNP) proteina residente, che viene rivelata utilizzando anticorpi anti-DNP (figura 21B).

Nel liquor dei pazienti SM, come mostrato in figura 21B, i livelli dei carbonili proteici sono stati trovati significativamente più elevati ( $p < 0.05$ ) rispetto ai controlli.

Un altro marker di ossidazione è rappresentato dall'ossidazione dei lipidi, misurata mediante il 4-idrossinonenale (HNE)(175,180), che si può riscontrare a livello encefalico in corso di stress ossidativo (181). L'HNE, formato dall'acido arachidonico o da altri acidi grassi insaturi in seguito all'attacco di radicali liberi, si lega, tramite la reazione di Michael alle proteine, particolarmente a residui di cisterna, istidina o lisina (181). La valutazione dei livelli di HNE nel liquor di pazienti SM ha evidenziato un aumento significativo di HNE legato a proteine ( $p < 0.05$ ) rispetto ai controlli (figura 21D).

La famiglia di proteine da stress da 70 kDa è uno tra i più studiati sistemi citoprotettivi. All'interno di questa famiglia sono presenti le forme costitutive, come la Hsc70, e le forme inducibili come la Hsp70 (o Hsp72). La figura 22 e la figura 23 mostrano un significativo ( $p < 0.05$ ) aumento nei livelli di espressione della Hsc70 e Hsp70 nei linfociti dei pazienti SM rispetto ai controlli (Figure 22A e 23A).

L'HO-1 (Hsp32) appartiene alla famiglia delle Hsp e protegge le cellule nervose dal danno ossidativo, tramite la degradazione dell'eme in ferro libero, monossido di carbonio e biliverdina (140,179). Quest'ultimo composto viene poi ridotto dalla biliverdina in bilirubina, un tetrapirrolo lineare con proprietà antiossidanti; più recentemente è stato dimostrato che la bilirubina contrasta

effettivamente lo stress nitrosativo, grazie alla sua attività legante l'ossido nitrico (NO) e i suoi derivati (RNS) (120,140).

L'isoforma costitutiva della emeossigenasi è la HO-2. Questa ricerca ha valutato i livelli di espressione di entrambe le isoforme nei linfociti dei pazienti SM e nei controlli, rivelando come nei pazienti SM i livelli di HO-1 fossero significativamente ( $p < 0.05$ ) superiori a quelli dei controlli; a tale risultato si accompagnava un concomitante abbassamento, sempre statisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) dei livelli di HO-2 nello stesso gruppo di esperimenti (Figure 24 e 25). L'analisi Western Blot dei linfociti dei pazienti SM ha, inoltre, evidenziato un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) dei livelli della tioredoxina, mentre i livelli del corrispondente enzima, la tioredoxina riduttasi 1 erano significativamente ( $p < 0.05$ ) ridotti (Figure 26 e 27).

Queste alterazioni sono associate con un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) dei carbonili proteici e del HNE (Figura 28).

Il plasma dei pazienti SM, analogamente, presentava livelli significativamente ( $p < 0.05$ ) più alti di HO-1 e Hsp-60 (Figure 29 e 30), mentre non si riscontravano differenze significative nei livelli di Hsp70 (Figura 31).

Inoltre, nei pazienti con SM sono stati riscontrati livelli significativamente ( $p < 0.05$ ) elevati di SIRT-1 (Figura 32), ma poiché questo è il primo studio in cui viene riscontrato tale dato, non si può escludere che ciò non sia direttamente correlato alla patologia.

## **Proteomica e Redox proteomica**

L'analisi proteomica consente lo screening delle modificazioni delle proteine in diverse condizioni patologiche (176); con l'elettroforesi bidimensionale e la colorazione con il blu di Coomassie è possibile ottenere la mappatura totale delle proteine presenti in un campione.

La mappa proteica dell'immagine di gel 2-D mostrata in figura 33 rappresenta un esempio di profili di espressione proteica di siero di soggetti controllo e soggetti affetti da sclerosi multipla.

Nel complesso i modelli di elettroforesi bidimensionale di siero controllo e SM appaiono simili, tuttavia la valutazione statistica ( $p \leq 0.05$ ) delle densità relative agli spots ha permesso di trovare 7 spots diversamente espressi nei soggetti SM con un aumento o un decremento rispetto ai controlli di almeno 1.5-fold.

Le proteine identificate sono: l'apolipoproteina A-1 up-regola 7.8 volte nel gruppo SM; Ig lambda-2 chain C regions down-regola 0.22 volte nel gruppo SM ; Ig K up-regola 2.11 volte nel gruppo SM; Ig K down-regola 0.0025 volte nel gruppo SM; Alpha-1B-glycoproteina Complement component C9 up-regola 2.4 volte nel gruppo SM. Ig gamma-1 chain C region down-regola 0.42 volte nel gruppo SM; Ig gamma-1 chain C region down-regola 0.092 volte nel gruppo SM.

Nella fig.34 è mostrata un'immagine di un gel 2-D di siero di soggetti controllo e di soggetti affetti da sclerosi multipla in cui sono evidenziate gli spots delle proteine diversamente espresse.

Gli spots di queste proteine sono stati asportati dal gel, digeriti con tripsina e poi analizzati con la tecnica MALDI. I risultati della spettrometria di massa sono stati usati per identificare le proteine utilizzando il programma Mascot Search Engine e sono riportati nella tabella 5.

La formazione dei gruppi carbonilici e la determinazione del grado di ossidazione proteica è stata eseguita tramite la redox proteomica.

La mappa bidimensionale e la successiva rivelazione immunochimica degli addotti-DNP ha evidenziato le proteine carbonilate nei campioni di siero di pazienti affetti da Sclerosi Multipla.

Parallelamente alla determinazione immunochimica dei carbonili, sono stati misurati i livelli di proteine mediante la colorazione con il blu di Coomassie.

L'elettroforesi bidimensionale e la colorazione con il blu di Coomassie ha consentito di ottenere la mappatura totale delle proteine presenti nel campione e l'immunoblotting con anticorpi anti-DNP ha permesso di individuare specifici addotti-DNP nei campioni di siero corrispondenti alle proteine sul gel. Il livello di gruppi carbonilici per unità di proteina è stato ottenuto dividendo il livello di carbonili di uno spot di proteina posto sulla membrana di nitrocellulosa con il livello del suo corrispondente spot posto sul gel.

La fig.35 mostra un quadro rappresentativo di 2D WB di siero di soggetti controllo e di soggetti affetti da sclerosi multipla. Rispetto ai controlli, il siero di soggetti SM mostra una proteina significativamente più ossidata, l'aptoglobina.

La freccia indica lo specifico spot nel quale si evidenzia - attraverso il programma di analisi delle immagini PDQuest 2D - una immunoreattività all'oxiblot significativamente maggiore nei soggetti SM rispetto ai soggetti controllo.

La tabella 5 riporta la proteina identificata con la spettrometria di massa, il numero di peptidi corrispondenti al database, la percentuale di copertura, il pI, i valori di PM e l'aumento dei livelli specifici dei gruppi carbonilici indicizzato come percentuale di controllo.



### 3. Antiossidanti e neuroblastoma

Gli effetti citoprotettivi dell'antiossidante HBB2 sono stati valutati mediante studi di vitalità cellulare in modelli *in vitro* in cellule di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y, sottoposte al trattamento ossidante con l'agente donatore di perossinitrito SIN-1. La Fig. 37 mostra la vitalità cellulare dopo trattamento con SIN-1 (1mM) (7h) in presenza ed in assenza di pretrattamento con HBB2(-24h), a diverse concentrazioni (2 $\mu$ M, 10 $\mu$ M), e con HBB2 (2 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) da solo per 24h.

In accordo a studi precedenti (182) (129), il trattamento con SIN-1 (1mM) riduce notevolmente la vitalità cellulare esercitando un effetto citotossico, rispetto a cellule non trattate o sottoposte al solo trattamento con HBB2 2 $\mu$ M, che rivelano, invece, un incremento della vitalità. Il perchè aumenta la resistenza cellulare al danno citotossico indotto dal SIN-1 (1mM). E' stato rilevato un decremento significativo della vitalità cellulare dopo trattamento con HBB2 (10  $\mu$ M), dimostrando così un effetto citotossico a tale concentrazione.

La vitalità cellulare dopo trattamento dose-response con HBB2 (2  $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20  $\mu$ M) è stata valutata per 6h e 24h (Fig.36).

I risultati ottenuti mostrano un aumento significativo della vitalità cellulare, rispetto ai controlli, ad una concentrazione pari a 2  $\mu$ M di HBB2, ed invece un effetto citotossico a concentrazioni maggiori (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M).

Studi sperimentali indicano il ruolo chiave svolto dalle Hsps negli effetti neuroprotettivi dal danno eccitotossico (183). La Fig 38 mostra l'analisi Western blot dei livelli di espressione proteica delle Hsp72, in cellule SH-SY5Y trattate per 7h SIN-1 (1mM), in presenza ed in assenza del pretrattamento (-24h) con HBB2 (2 $\mu$ M). Questi risultati dimostrano un incremento significativo, rispetto ai controlli, dell'espressione proteica delle Hsp72 dopo trattamento con SIN-1.

Gli effetti citoprotettivi dell'L-acetil-carnitina (LAC) sono stati valutati mediante studi di vitalità cellulare in cellule di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y sottoposte al trattamento ossidante con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Per stabilire la concentrazione necessaria per effettuare gli esperimenti di citoprotezione sulle cellule di neuroblastoma SH-SY5Y con la sostanza antiossidante (LAC), è stata valutata la vitalità cellulare dopo trattamento dose-resposta con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,02mM; 0,05mM; 0,1mM, 0,2mM; 0,4mM, 0,8mM, 1mM) per 12 h. Nella fig. 39 è mostrato un grafico che evidenzia la concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pari a 0,2mM) in cui si ha il 50 % di vitalità cellulare da utilizzare per il piano sperimentale.

La Fig. 40-41 mostra il grafico della vitalità cellulare dopo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) in presenza ed in assenza di pretrattamento con LAC (6h e12h), a diverse concentrazioni (20μM, 50μM, 100μM ), e con LAC (20μM, 50μM, 100μM) da sola per 6h. Il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2 mM) riduce notevolmente la vitalità cellulare esercitando un effetto citotossico, rispetto alle cellule non trattate o sottoposte al solo trattamento con LAC, che rivelano, invece, un incremento della vitalità. Il pretrattamento a -6h con LAC (20μM, 50μM, 100μM ) non è sufficiente ad attivare la funzione citoprotettiva del composto in esame (Fig.40), mentre il pretrattamento a 12h con LAC (20μM, 50μM, 100μM) determina un marcato effetto citoprotettivo, aumentando la resistenza cellulare al danno citotossico indotto dal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) (Fig. 41).

Numerosi studi sperimentali indicano il ruolo chiave svolto dalle Hsps nei fenomeni neuroprotettivi dal danno eccitotossico (184). In accordo con i dati di vitalità cellulare le Fig 42-43 non mostrano attivazione delle Hsp70 e dell'HO-1 nelle cellule pretrattate a 6h con LAC (20μM, 50μM, 100μM) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM)(-1h). I grafici nelle fig.44-45 dimostrano i livelli di espressione proteica delle Hsp-70 e dell'HO-1 in cellule SH-SY5Y trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h), in presenza ed in assenza del pretrattamento (12h)

con LAC (20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M). I risultati sulle cellule di neuroblastoma mostrano cambiamenti significativi dell'espressione proteica delle Hsp70, rispetto ai controlli ed alle cellule trattate solo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h), nelle cellule pretrattate con LAC ad una concentrazione di 50 $\mu$ M (12h) e dell'HO-1 ad una concentrazione di LAC di 20 $\mu$ M e 50 $\mu$ M.

Questi risultati sostengono l'ipotesi che, l'L-acetilcarnitina up-regolando il sistema dei vitageni, può limitare le conseguenze dello stress ossidativo e nitrosativo associato all'invecchiamento e alle patologie correlate all'età.

#### **4. Carnosina e lesione al midollo spinale (SCI)**

Le "heat shock response" contribuiscono ad instaurare uno stato citoprotettivo in un'ampia varietà di patologie umane, in particolare durante l'invecchiamento e i disordini neurodegenerativi (177,179). A tale riguardo, sono stati misurati, come markers di stress ossidativo, i livelli di espressione dell'Hsp-70, in topi esposti a SCI in assenza o in presenza di L-carnosina o D-carnosina rispetto ai topi controllo.

La Fig.46 mostra i livelli di espressione delle Hsp-70, infatti, nel gruppo di topi SCI + soluzione fisiologica rispetto ai topi controllo le proteine Hsp-70 aumentano significativamente, mentre nei topi trattati con D-carnosina (150mg/Kg), le Hsp-70, diminuiscono significativamente rispetto ai topi trattati con L-carnosina.

Questi risultati dimostrano che ci sono ampie differenze tra la D-carnosina e L-carnosina. I derivati della carnosina presentano proprietà antiossidanti simili a quelle del dipeptide di origine, inoltre, la D-carnosina resiste all'attacco della carnosinasi, per cui i derivati della carnosina potrebbero essere studiati come potenziali agenti terapeutici utili per limitare gli effetti deleteri dello stress ossidativo e nitrosativo associato ai disordini

neurodegenerativi e all'invecchiamento. Questi risultati dimostrano l'importanza della risposta cellulare allo stress nei meccanismi di difesa contro l'insulto neurotossico.

## **DISCUSSIONE**

La disfunzione mitocondriale è caratteristica di molti disordini neurodegenerativi (185-188), e le evidenze che i mitocondri rappresentano il sito di inizio del danno nei disordini neurodegenerativi, è parzialmente basata sul decremento dell'attività dei complessi della catena respiratoria nella malattia di Parkinson, nella malattia di Alzheimer, e nella malattia di Huntington (187).

Nuove evidenze sostengono l'ipotesi di un coinvolgimento del danno ossidativo nella patogenesi della Sclerosi Multipla, ed indicano che i sistemi antiossidanti endogeni sono meno funzionanti nella SM e che il danno mitocondriale, indotto dalla perossidazione lipidica, può determinare una ulteriore produzione dei radicali dell'ossigeno (ROS) (189,190).

Tali deficienze nell'attività dei complessi della catena respiratoria, possibilmente associati con una perturbazione del bilancio ossidante/antiossidante (191,192), stanno alla base dei difetti del metabolismo energetico e dell'induzione della degenerazione cellulare.

### **Invecchiamento**

L'invecchiamento nei mammiferi è caratterizzato da una graduale e continua alterazione della qualità delle funzioni e delle reazioni fisiologiche, che iniziano in piena maturità. Il danno sembra essere più evidente nelle funzioni che dipendono dalla risposta integrata del sistema nervoso centrale piuttosto che nelle funzioni del sistema renale o cardiovascolare(193,194). Nella presente ricerca è stata purificata una forma ricombinate della carnosina umana (CN1; EC 3.4.13.20), con un protocollo che permette la preparazione

di una quantità sostanziale dell'enzima in poco tempo. Dal coniglio è stato preparato uno specifico anticorpo policlonale per la CN1.

Inoltre, è stato prodotto un clone cellulare stabile che esprime livelli costanti dell'enzima. L'uso di questo clone è un prerequisito necessario per lo studio molecolare dell'enzima e per chiarire il suo ruolo negli eventi patologici e fisiologici della cellula, facendo attenzione all'equilibrio redox nelle cellule nervose. La CN1 è, in realtà, un enzima trovato quasi esclusivamente nel tessuto cerebrale e nel siero (195).

È stato suggerito che concentrazioni relativamente alte dell'enzima nel cervello di uomo e nel CSF indicano che possa essere stato sintetizzato nel cervello e secreto nel CSF (195).

In questo studio è riportato un aumento dell'espressione e dell'attività della carnosinasi (CN1) nel cervello invecchiato. L'induzione massima è stata notevolmente osservata nella sostanza nera (SN) e nell'ippocampo, aree cerebrali più vulnerabili al danno ossidativo e agli effetti dell'invecchiamento.

Tutto questo potrebbe avere importanti implicazioni patofisiologici, in quanto il possibile aumento di espressione e di attività della CN1, con un decremento dei livelli di carnosina, può avere come conseguenza un significativo decremento del potenziale antiossidativo, che si verifica durante l'invecchiamento, come ampiamente descritto in letteratura. L'invecchiamento è caratterizzato da un generale declino delle funzione fisiologiche che colpiscono soprattutto il cervello, particolarmente suscettibile agli effetti del danno ossidativo.

In questo contesto, numerose evidenze supportano l'opinione di molti ricercatori che la riduzione dell'espressione cellulare e l'attività di proteine antiossidanti con il conseguente aumento dello stress ossidativo sono cause fondamentali dell'invecchiamento e delle malattie neurodegenerative (196-198). Il glutathione ridotto è la più abbondante proteina non tiolica nelle cellule animali.

La sintesi de novo ed il recupero del GSH mantiene un ambiente cellulare ridotto, nel quale il tripeptide è un cofattore degli enzimi citoplasmatici e può agire come un importante agente modificante post-traslazionale nelle proteine cellulari (199).

A causa della cisteina tiolica, il glutatione reagisce come un nucleofilo con le specie elettrofile sia esogene che endogene. Come conseguenza, le specie reattive dell'ossigeno e nel nitrogeno (ROS, RNS) sono frequentemente individuate dal GSH sia nelle reazioni spontanee che catalitiche (200). Poichè i ROS ed i RNS hanno avuto un ruolo determinante negli eventi di segnalazione cellulare, così come nelle patologie di malattie umane, uno squilibrio, fra l'espressione del GSH e degli enzimi associati, deve essere implicato in molte condizioni patologiche (201).

Quindi, il danno delle funzioni del CNS, negli animali invecchiati, è associato con un sensibile aumento dello sviluppo di molte malattie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer (AD), la malattia di Parkinson (PD) e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (193,202). In questi studi è stato dimostrato che lo stress ossidativo aumenta durante l'invecchiamento nel cervello, come decremento del contenuto di GSH e come aumento di GSSG, così come i markers di ossidazione proteica e lipidica, come l'idrossinonenale e le proteine carbonilate. Questi cambiamenti sono particolarmente significativi ( $p < 0.05$ ) nelle aree cerebrali dell'ippocampo e della sostanza nera (SN) ed in minor misura nella corteccia, nel setto e nello striato, mentre il cervelletto mostra un'elevata resistenza a questo cambiamento ossidativo. In accordo alla teoria dell'invecchiamento, questo è coerente con i risultati sperimentali che dimostrano come l'ippocampo si atrofizza durante l'invecchiamento ed in alcune malattie neurologiche, tutti processi associati con la memoria e con il deterioramento cognitivo (203,204).

Inoltre, pazienti con malattia di Alzheimer, da precoce a moderata, hanno un decremento del 25% del volume ippocampale se comparati con i controlli sani (204,205) e dopo la morte mostrano un marcato danno ultrastrutturale nei neuroni ippocampali, specialmente nei mitocondri (206).

Il più importante sintomo biochimico dell'invecchiamento e di molte condizioni correlate all'età è lo stress proteotossico, risultato dell'accumulo di proteine alterate, che derivano da errori biosintetici o da deleterie modificazioni post-sintetiche dei poliptidi o da entrambi (207).

Le cellule rispondono allo stress sub-letale da calore con una sintesi preferenziale e con l'accumulo di diversi membri di una distinta famiglia funzionale e compartimentale di proteine dello shock (o stress) termico (come Hsp70, Hsp90, Hsp60 e l'eme ossigenasi-1: HO-1). L'espressione dei geni che codificano le Hsps è stata trovata in diverse popolazioni cellulari del sistema nervoso centrale (CNS), incluso le cellule neuronali, della glia e quelle endoteliali (5). Nel sistema nervoso, le Hsps sono indotte da un'ampia varietà di condizioni patologiche, inclusa l'ischemia cerebrale, l'epilessia, il trauma ed i disordini metabolici e neurodegenerativi (21). In questa ricerca è stato trovato che i livelli delle Hsp72 nei ratti senescenti sono significativamente elevati rispetto a quelli invecchiati, con un profilo di espressione più alto nell'ippocampo e nella sostanza nera, seguito dal setto, dal cervelletto, dalla corteccia e dallo striato. Simili patterns di espressione, come funzione dell'invecchiamento, sono stati osservati quando è stata indagata l'HO-1, concludendo che questi geni citoprotettivi lavorano insieme nella risposta cellulare allo stress. Inoltre, nel cervello invecchiato, è stato dimostrato un aumento di espressione della proteina tioredoxina riduttasi, possibilmente correlata al decremento dell'espressione delle proteina tioredoxina misurata in tutte le aree cerebrali studiate. Sebbene l'espressione di questi due geni sia coordinativamente regolata, nelle nostre condizioni sperimentali, è stato trovato un difetto di coordinazione coerente con quello



trovato nel cervello degli AD (208). Inoltre, è stata trovata nell'ippocampo una significativa correlazione fra l'up-regolazione dell'Hsp72 e dell'HO-1 ed un decremento del contenuto di gruppi sulfidrilici delle proteine, che hanno seguito cambiamenti paralleli nello stato redox GSH=GSSG, confermando il ruolo, generalmente accettato, dello stato redox come segnale per l'attivazione di risposte protettive, come la sintesi delle heat-shock proteins. Nell'insieme, questi risultati, suggeriscono che l'aumento di espressione con l'età, delle Hsps, avviene come una conseguenza della perturbazione dello stato redox e questo potrebbe avere un ruolo nel limitare le conseguenze deleterie associate con la denaturazione delle proteine. Inoltre, nei ratti senescenti comparati con i controlli invecchiati, è stato trovato un decremento dell'espressione dell'Hsp90 nelle aree cerebrali dell'ippocampo, della corteccia, mentre nella SN le Hsp90 sono up-regolate. Questi dati potrebbero essere rilevanti per la teoria che collega l'invecchiamento ai disordini neurodegenerativi, infatti, è dimostrato che l'Hsp90, come chaperone molecolare, è un target per la nitrosilazione e la S-nitrosilazione ed abolisce l'attività ATPase, che è necessaria per la sua funzione di chaperone. Dunque, l'inattivazione del Hsp90 permette l'accumulo degli aggregati  $\tau$  e  $\beta$ -amiloide nel cervello degenerato. Inoltre, parecchie evidenze sostengono l'idea che l'inibizione dell'Hsp90 guida il decremento dei livelli di p-tau, suggerendo che, bloccando la via di ripiegamento mediata dall'Hsp90, si favorisce la rotazione di p-tau, attraverso la degradazione. Comunque, la somministrazione periferica di un nuovo inibitore del Hsp90 favorisce il selettivo aumento della specie p-tau in modelli di topi con taupatia, suggerendo inoltre un ruolo centrale per il complesso dell'Hsp90 nella patogenesi delle taupatie. In accordo con questa ipotesi, il decremento dell'espressione dell'Hsp90, osservata nelle aree cognitive del cervello, come la corteccia e l'ippocampo, può essere considerato come un meccanismo compensativo per limitare le conseguenze deleterie associate con

iperfosforilazione patologica, come quella osservata nel cervello degli AD e nei modelli di topi senescenti SAMP8 (209). Dunque la modulazione farmacologica della via dello stress cellulare è un'area emergente nel trattamento delle malattie umane, non solo dei disordini neurodegenerativi ma anche delle malattie cardiovascolari e nel cancro.

In attinenza a tutto questo, si sta dedicando il recente interesse allo sviluppo di abili interventi nutrizionali per segnalare i vitageni come citoprotettivi redox sensibili, coinvolti nel controllo dell'omeostasi del processo definito di longevità-assicurata. Gli antiossidanti dietetici, come i polifenoli, la carnitina e la carnosina sono stati recentemente dimostrati in vitro, sembra che siano neuroprotettivi mediante l'attivazione della via ormetica, incluso i vitageni (119,140, 196,197).

In particolare, è stato dimostrato in esperimenti di cellule, che la carnosina possiede l'abilità di eliminare i radicali liberi NO e la capacità di intrappolare NO (210) ed è anche capace di prevenire, negli astrociti, l'up-regolazione dell'iNOS e l'induzione sia dell'HO-1 che dell'Hsp-70 dopo stress nitrosativo (211). Questi risultati dimostrano che l'incremento della carnosinasi aumenta la suscettibilità agli effetti tossici dello stress ossidativo, e questo sembra essere rilevante per la teoria dell'invecchiamento dei radicali liberi. Considerato che (a) la NOS neuronale è aumentata nel cervello invecchiato, (b) la carnosina protegge le cellule dall'induzione tossica nell'AD (212,213), e che (c) i livelli di carnosina nel plasma sono più bassi nei pazienti AD che nei controlli comparati per età (214), si pensa che l'aumento della carnosinasi, che mostra una specificità regionale, è un fattore che contribuisce alla patogenesi correlata all'età, che agisce, con differente severità, in diverse aree cerebrali invecchiate. Inoltre, è stata recentemente individuata una istidina contenuta nel dipeptide resistente all'idrolisi della carnosinasi (215-217), e sono state suggerite applicazioni farmacologiche per le patologie neurodegenerative.

Quindi il deterioramento delle funzioni del sistema nervoso centrale (CNS) negli animali invecchiati è associato con la suscettibilità a sviluppare molte malattie neurodegenerative come AD, PD, ed ALS (140,196,197). È noto che le proteine danneggiate ossidativamente aumentano notevolmente con l'età (218-220). Inoltre, nel cervello, è stato documentato il verificarsi che la presenza di gruppi proteici sulfidrilici e la riduzione dell'attività di importanti enzimi metabolici sono funzione dell'invecchiamento (221-223). Studi sull'induzione della risposta delle HSP, un meccanismo citoprotettivo che contrasta il danno ossidativo, mostrano una specificità regionale, indicando che le diverse aree cerebrali potrebbero andare incontro a differenti ossidazioni per proteggere se stesse dalla forza dell'insulto (151,186,224). È stato utilizzato un'approccio di redox proteomica per identificare le proteine modificate ossidativamente in quattro differenti regioni di ratti di 28 mesi di età rispetto a quelli di 12 mesi di età., molte di Queste proteine sono coinvolte nelle vie metaboliche energetiche, incluso la produzione di ATP, la glicolisi e il ciclo di Krebs. Inoltre, l'ossidazione delle proteine colpisce anche i componenti cellulari coinvolti nella struttura della cellula, il sistema di trasduzione del segnale e la risposta cellulare allo stress, come l'Hsp-70. Alla famiglia delle proteine da stress di 70-kDa appartiene la forma costitutiva delle Hsp70, che comprende l'Hsc70, e la forma inducibile delle Hsp70 (chiamata anche Hsp72); e il GRP78 (una proteina costitutivamente espressa che regola il glucosio, trovata nel reticolo endoplasmatico) (5, 225) ed è una famiglia di molecole di chaperoni che contribuiscono alla protezione contro una varietà di stress, che previene l'aggregazione cellulare, assistendo il ripiegamento delle proteine danneggiate ed i polipeptidi nascenti lungo i ribosomi. L'Hsp70 mostra livelli di espressione molto bassi nel cervello in condizioni fisiologiche, ma è indotta dopo stress ossidativo. L'Hsp70 è presente nel citosol, nel nucleo e nel reticolo endoplasmatico (186). È stato trovato che l'Hsp70 inducibile (Hsp72) è presente ad elevati livelli nella

sostanza nera, seguita dal setto, cervelletto, striato, ippocampo e corteccia (186,224,226). Hsc70 è un'isoforma costitutiva, reclutata dalle cellule come prima difesa nei confronti di condizioni sfavorevoli.

Studi precedenti in ratti invecchiati hanno trovato che i livelli basali di Hsc-70 sono significativamente alti nella sostanza nera, seguita dal setto, dall'ippocampo, dallo striato e dal cervelletto con più bassi livelli nella corteccia (226).

La proteina 78 che regola il glucosio (GRP78) agisce come chaperone molecolare con legame transitorio alle proteine attraverso il reticolo endoplasmatico ed aiuta il loro ripiegamento, assemblaggio e trasporto. Il GRP78 è il principale costituente coinvolto nella risposta delle "proteine unfolded". Diminuendo la sua funzionalità il GRP78 può guidare un decremento dell'attività del proteosoma con un conseguente aumento delle "proteine misfolded" all'interno della cellula (227). Questi dati sulle modificazioni ossidative degli chaperoni molecolari nello striato, nel cervelletto, e nella corteccia possono guidare ad un crescente accumulo di proteine misfolded, una delle principali caratteristiche comuni che si verificano nell'invecchiamento e nei disordini neurodegenerativi (228-233). Nella presente ricerca sono state identificate diverse proteine che sono significativamente più ossidate nel cervello di ratti senescenti rispetto ai ratti invecchiati. Le proteine modificate ossidativamente sono in alcuni casi simili a quelle trovate nel cervello di AD (234-236), confermando che l'invecchiamento è uno dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo di malattie neurodegenerative. Sebbene, le eziologie sono differenti e probabilmente multifattoriali, l'invecchiamento e le malattie neurodegenerative correlate all'età condividono alcuni meccanismi patologici comuni, tra i quali l'insufficienza energetica è una delle disfunzioni più cruciali per i neuroni (237). Inoltre, modelli animali di invecchiamento possono essere particolarmente utili per l'identificazione dei markers

biologici e per fornire ulteriori approfondimenti dei meccanismi molecolari dello sviluppo cerebrale, invecchiamento e neurodegenerazione.

### **Sceloris multipla**

La Sclerosi Multipla è una patologia relativamente comune, ad eziologia non ben conosciuta, in cui non è possibile operare dei trattamenti radicali, ed è la causa principale di disabilità nei giovani adulti, colpendo quasi tre milioni di persone nel mondo.

Tradizionalmente è considerata una patologia infiammatoria demielinizzante che colpisce la sostanza bianca del SNC e che determina vari gradi di disabilità, a seconda dei sistemi funzionali interessati (238).

Recentemente, però, la SM non è più stata considerata solamente una patologia infiammatoria, ma un disordine neurodegenerativo in cui sono presenti danno assonale, perdita neuronale ed atrofia del parenchima cerebrale che determinano disabilità neurologiche permanenti (239-241).

Tuttavia, la up-regulation dei sistemi antiossidanti negli astrociti e nei macrofagi nelle placche attive, così come nei leucociti, suggerisce che la protezione endogena nei confronti dello stress ossidativo può limitare in parte i danni provocati da quest'ultimo (238,242). Inoltre, è stato evidenziato che la somministrazione di antiossidanti esogeni produce effetti benefici in modelli animali di SM, ma finora non vi sono evidenze cliniche per utilizzare tali terapie nell'uomo (243-246). Il possibile legame tra la SM e l'imbalance dei sistemi redox è indicato dagli aumentati livelli di malonaldeide e F2-isoprostani nei pazienti rispetto ai soggetti controllo affetti da altre patologie neurologiche e da un'inappropriata espressione di Hsps negli oligodendrociti (117, 247,248). Quest'ultimo evento potrebbe rappresentare un possibile fattore promotore delle placche, capace di determinare la successiva resistenza o suscettibilità cellulare al danno ossidativo. In precedenti studi è stata già dimostrata la presenza di elevate quantità di NO, perossinitrito e

superossido nel liquor di pazienti con SM (111,115). La glia attivata secerne prodotti derivati dal NO (RNS) che reagiscono con il radicale superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) per formare l'anione perossinitrito ( $ONOO^-$ ). I RNS possono causare stress nitrosativo, che determina la distruzione della guaina mielinica e degli oligodendrociti (249). In più, la formazione di S-nitroglutazione (GSNO) può causare deplezione del glutathione ridotto (GSH) e, quindi, dare l'avvio a delle modificazioni redox nel signaling cellulare, come l'alterazione di enzimi chiave intracellulari, in particolare quelli della catena respiratoria (250).

In questo studio, sono stati riscontrati incrementi significativi di markers ossidativi, come i carbonili proteici e l'idrossinonenale (HNE) nel liquor, nei linfociti e nel plasma di soggetti affetti da SM, rispetto ai controlli. Queste modifiche erano associate con una concomitante induzione delle stress proteins (Hsps), in particolare HO-1, Hsp72, Hsp60 e tioredoxina (Trx), negli stessi campioni.

L'HO-1 è una proteina localizzata nel reticolo endoplasmatico, che forma un complesso con la NADPH-citocromo-c450 riduttasi; è l'enzima limitante nella produzione della bilirubina e, nel decennio passato, è stato focalizzato il suo ruolo potenziale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare. La reazione catalizzata dall'HO-1 determina il clivaggio ossidativo della molecola dell'eme, formando biliverdina e CO, mentre il ferro viene ridotto allo stato ferroso grazie all'azione della NADPH-citocromo-c450 riduttasi (193). L'ulteriore degradazione della biliverdina in bilirubina richiede l'azione di un enzima citosolico, la biliverdina reduttasi (251). L'HO-1 è presente in vari tessuti, ma la sua attività è molto più elevata a livello dell'encefalo, fegato, milza e testicoli. Sono state scoperte tre isoforme di HO: la HO-1, o forma inducibile, la HO-2, o forma costitutiva, e la HO-3, finora evidenziata solo nel ratto (21,119,149,225,252).

L'aumento dei livelli e dell'attività di HO-1 nella SM è probabilmente dovuto all'elevato stress ossidativo. Questa affermazione viene confermata da

varie evidenze, che suggeriscono che l'espressione del gene dell'HO-1 è redox regolato, e, come per altri enzimi antiossidanti, questo avviene perché contiene, all'interno del promoter, degli elementi di risposta antiossidante (ARE) (252). Per questo il gene dell'HO-1 è sottoposto a una modulazione redox sensibile mediante fattori di trascrizione che riconoscono specifici siti di legame all'interno del promoter e delle regioni enhancer distali del gene stesso dell'HO-1 (120,121).

Inoltre l'HO-1 è rapidamente upregolata dallo stress ossidativo e nitrosativo e dalla deplezione di glutatione (253). È stato suggerito che un'inappropriata risposta allo stress nel SNC può influenzare sia la permeabilità della barriera ematoencefalica che l'espressione delle Hsps, determinando così la formazione della lesione attiva (193, 241,254). Inoltre, citochine, immunoglobuline e componenti del complemento possono elicitare una risposta di sopravvivenza cellulare che coinvolge l'induzione di Hsps endogene e di altre molecole protettive, le quali suggeriscono che il meccanismo redox-dipendente in queste cellule è di grande importanza nella patogenesi della SM. (255-257).

La risposta heat shock contribuisce a stabilire uno stato citoprotettivo in una grande varietà di situazioni patologiche che coinvolgono il SNC (121,258). Nei mammiferi l'attivazione della risposta heat shock richiede l'attivazione e la traslocazione nel nucleo di numerosi fattori di trascrizione, che controllano l'espressione di specifici set genici che codificano per Hsps protettive (193, 241).

Le Hsps si comportano da chaperoni, legando altre proteine e controllandone il corretto ripiegamento, la corretta conformazione ed il traffico proteico attraverso membrane ed organelli o regolando la disponibilità di un recettore o l'attività di un enzima.

La famiglia delle Hsps da 70 kDa comprende la Hsc70 (la forma costitutiva), la Hsp70 (o Hsp72, la forma indotta) e la GRP75 (una proteina

glucosio-correlata costitutivamente espressa che si riscontra nel reticolo endoplasmico). Dopo un insulto a livello del SNC l'Hsp70 viene sintetizzata ad alti livelli ed è presente nel citosol, nel nucleo e nel reticolo endoplasmico (193).

Le proteina chaperone Hsp60 è codificata nel nucleo ed è presente nei mitocondri e ha un ruolo protettivo nei dell'ischemia delle cellule nervose in vivo, dopo iperespressione indotta da virus (5, 254). Essa forma il complesso chaperonina, che sembra essere implicato nel ripiegamento e nell'assemblaggio delle proteine mitocondriali in condizioni di normalità (259). La Hsp60, insieme alla sua co-chaperonina Hsp10, determina il corretto ripiegamento delle proteine mitocondriali e corregge il misfolding proteico, che si verifica in condizioni di stress ossidativo (259). Mutazioni del gene HSPD1, che codifica per l'Hsp60, sono state riscontrate recentemente nella paraplegia spastica familiare 13, una malattia neurodegenerativa autosomica dominante, caratterizzata da progressiva ipostenia e spasticità degli arti inferiori, e nella chaperonopatia Hsp60, dovuta ad una mutazione missenso D29G, che determina ipomielinizzazione cerebrale e leucodistrofia. Questi studi hanno dimostrato il ruolo chiave della Hsp60 chaperonina nei processi di normale mielinizzazione e nella patogenesi di diverse malattie ipomielinizzanti (260).

In questo studio, è stato anche riscontrato un aumento dei livelli di espressione della tioredoxina nei pazienti rispetto ai controlli. La tioredoxina è un regolatore redox intracellulare che svolge un importante ruolo nella regolazione dei fattori di trascrizione redox-sensibili (5). Nel suo stato ridotto, la tioredoxina può riattivare, tramite ossidazione, fattori di trascrizione inattivi come Jun, Fos, AP-1, il redox factor-1 (ref-1) e Nrf-2 (260). La tioredoxina-reduttasi è una flavoproteina che catalizza la riduzione NADPH-dipendente della proteina tioredoxina ossidata. È usualmente localizzata nel citosol, ma può traslocare nel nucleo in risposta a vari stimoli associati allo stress



ossidativo. La tioredoxina-reduttasi gioca un ruolo fondamentale nella protezione cellulare contro lo stress ossidativo e nella regolazione della crescita e morte cellulare. È espressa costitutivamente in differenti tipi cellulari, nei mammiferi, incluse le cellule neuronali sottoposte a stress nitrosativo. Studi in vivo ed in vitro hanno dimostrato che la tioredoxina e la tioredoxina-reduttasi svolgono un ruolo protettivo contro le azioni citotossiche mediate dai ROS (196).

In questa ricerca è stato dimostrato che la tioredoxina-reduttasi è ridotta nei linfociti dei pazienti SM e tale dato assume una rilevanza maggiore se consideriamo, che in uno studio precedente, era stato evidenziato come nel liquor e nel plasma di pazienti SM era presente un significativo decremento del rapporto GSH/GSSG (111, 115). In accordo con questi dati, è possibile affermare che la regolazione dello stato redox cellulare di diversi eventi cellulari è data dalla cooperazione tra tioredoxina e sistema del glutatione (261). Infatti, entrambi questi sistemi sono coinvolti in una serie di reazioni redox-dipendenti, come la donazione di equivalenti riducenti per la ribonucleotide-reduttasi e la peptide-metionina-sulfossido-reduttasi, quest'ultima coinvolta nella difesa cellulare contro le specie ossidative e la regolazione dello stato redox cellulare (196).

Le modifiche dello stato redox in corso di SM osservate in questo studio sono supportate anche dalla presenza di maggiori livelli di Sirt-1 nel plasma di pazienti SM rispetto ai controlli.

Le sirtuine sono coinvolte nella regolazione di importanti processi cellulari, come l'apoptosi, la differenziazione cellulare, la trasduzione energetica e l'omeostasi del glucosio, ma anche nella promozione della plasticità sinaptica e della neuro genesi in risposta a esercizio, restrizione dietetica ed energetica ed altri fattori ormetici ambientali (5, 121). A causa del loro ruolo nella risposta da stress cellulare, si ritiene che le sirtuine possano esercitare importanti funzioni nella risposta adattativa delle cellule nervose

allo stress, in particolare nella patogenesi della SM. A supporto di questa ipotesi, è stato dimostrato che la Sirt-1 interagisce sia direttamente che indirettamente con diversi pathways coinvolti nella plasticità neuronale, incluse la risposta mediata dall'adenosina monofosfato (AMP) ciclico e dalla proteina legata alla  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina e i sistemi Nf-KB (121). Tale dato risulta quindi essere molto promettente, in quanto la Sirt-1 potrebbe essere un ottimo target candidato per le terapie delle malattie neurodegenerative e metaboliche (260).

In conclusione, la disponibilità di biomarkers affidabili può radicalmente modificare, in futuro, l'approccio terapeutico alla SM, soprattutto nelle fasi attive della malattia. Inoltre, l'identificazione di nuovi biomarkers che possano orientare nella valutazione dell'andamento della patologia in popolazioni ad alto rischio, permetterebbe di effettuare degli interventi terapeutici per evitare il "viraggio" della patologia da forme con disabilità lieve-moderata a forme con disabilità severa e degli interventi diagnostici per valutare i pazienti "responder" e i pazienti "non-responder" alle terapie disponibili (121).

### **Proteomica SM**

Studi recenti sia in campo clinico che su animali ci portano a dire che l'NO e il perossinitrito sono coinvolti nella patogenesi della MS (18).

La possibilità di studiare le complesse funzioni di queste cellule gliali e di vedere come interagiscono con le cellule del sistema immunitario è cruciale per trovare un modo per contenere il danno alla mielina e nel far sopravvivere il tessuto danneggiato. La possibile correlazione tra la MS e la perturbazione dell'equilibrio redox cellulare è supportata da diversi fattori: l'incremento dell'incidenza della MS nelle popolazioni che consumano alte quantità di grassi animali che contengono bassi livelli di vitamina E la quale si trova associata ai grassi di origine vegetale (262); alti livelli di gruppi dinitrofenilici

(DNP) nella sostanza cerebrale bianca e grigia di soggetti affetti da MS (263); alti livelli di 4-HNE nelle placche dei cervelli di soggetti con MS (264); alti livelli di malonaldeide nel sangue e bassa attività della glutazione perossidasi in linfociti, eritrociti e granulociti di soggetti affetti da MS (265); un decremento dei gruppi sulfidrilici ed un incremento dei prodotti della perossidazione lipidica nel liquor e nel plasma di soggetti affetti da MS (266, 267); espressione delle Hsp-72 in cervelli di soggetti con MS associata con la proteina basica della mielina (MBP) (268); espressione dell'HO-1 in cellule astrogliali umane dove viene indotta dalla MBP (269) inoltre, e' stata riscontrata un alterata espressione delle hsps negli oligodendrociti (270). Questo ultimo evento potrebbe rappresentare un possibile fattore scatenante a livello delle lesioni della MS capace di modulare la suscettibilità delle cellule allo stress ossidativo. Lo stress nitrosativo in astrociti isolati in vitro produce un cambiamento nel pool endogeno dei tioli associato all'induzione delle Hsp-32 (emeossigenasi-1) la quale è inibita da agenti antiossidanti. Questi dati portano alla conclusione che esiste una correlazione tra stress ossidativo, funzione sulfidrilica e pathway dell'heat shock (158) e che nel sistema nervoso centrale i composti attivi dal punto di vista redox come il glutazione e l'equilibrio complessivo tra specie chimiche ossidanti ed antiossidanti sono potenzialmente di grande importanza nella MS (24).

In questo studio abbiamo usato un approccio di proteomica e di redox proteomica per identificare rispettivamente le proteine differenzialmente espresse e ossidate nel siero di pazienti affetti da Sclerosi Multipla.

Questi risultati mostrano sette proteine differenzialmente espresse in campioni di siero di SM rispetto ai CTR ed una proteina ossidata: queste proteine sono coinvolte nel metabolismo lipidico e nella risposta infiammatoria.

In accordo con i dati riportati in letteratura questi risultati mostrano un elevato livello di espressione nei soggetti SM dell' $\alpha$ -1-glicoproteina,

complemento C9, dell'apolipoproteina-A1 (apoA1) oltre alle immunoglobuline (271).

E' stato dimostrato che l'apoA1 ha un ruolo importante nel metabolismo lipoproteico del sistema nervoso centrale. ApoA1 è la principale apolipoproteina associate con HDL, un deficit di ApoA1 nell'uomo guida un fenotipo con bassi livelli di HDL nel plasma e ad una prematura aterosclerosi (272). Topi knockout ApoA1 mostrano una evidente riduzione nel plasma di livelli di HDL (273, 274) che si riflette nei livelli di colesterolo nel plasma (275).

L' $\alpha$ -1-glicoproteina ed il complemento C9 partecipano alla risposta infiammatoria, anche se non si conosce bene la loro funzione. Alti livelli di espressione dell' $\alpha$ -1-glicoproteina sono stati trovati anche in diversi studi condotti sul liquido cerebro spinale (CSF) di pazienti affetti da sclerosi multipla (276-279).

I nostri dati mostrano infine l'ossidazione dell'aptoglobina a livello dei gruppi carbonili. Nel plasma, l'aptoglobina ha il compito di legare, in maniera irreversibile, l'emoglobina libera rilasciata dagli eritrociti facilitando così la sua rimozione e inibendo la sua attività ossidativa. In malattie neurologiche infiammatorie sono stati osservati livelli alterati di aptoglobina (280).

I risultati di questo studio supportano il possibile coinvolgimento dei ROS e RNS nella patogenesi della Sclerosi Multipla a livello della circolazione periferica. Lo stress ossidativo a livello periferico nel sangue di soggetti con MS potrebbe essere una conseguenza di quello presente a livello centrale e conferma ancora una volta che le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto hanno un ruolo centrale nella patogenesi di queste malattie neurodegenerative.

Lo studio effettuato può costituire la base di partenza per nuovi esperimenti volti ad individuare potenziali target di una terapia neuro

protettiva in grado, se somministrata adeguatamente, di prevenire oppure limitare i danni dovuti allo stress ossidativo.

### **Antiossidanti e Cellule**

Un efficiente funzionamento dei processi di mantenimento e riparazione sembra essere cruciale per la sopravvivenza e la qualità fisica della vita. Ciò è mantenuto da un complesso network dei cosiddetti “processi di assicurazione della longevità”, costituiti dai *vitageni* (4, 178, ). Tra questi, le chaperonine sono proteine altamente conservate e responsabili della preservazione e riparazione della corretta conformazione delle macromolecole cellulari, come le proteine, l’RNAs ed il DNA (281). Le chaperonine insieme alle heat shock proteins hanno la funzione di proteggere le cellule da una grande varietà di condizioni tossiche, come temperature estreme, stress ossidativo, infezioni virali, e esposizione a metalli pesanti o farmaci citotossici (282-284). Mutazioni silenti del *Chaperone-buffered* possono essere attivati durante i processi di invecchiamento, portare all’esposizione fenotipica di caratteristiche non ancora manifestate, e contribuire all’esordio delle malattie poligeniche, come i disordini relativi all’età, aterosclerosi e cancro (285). Inoltre, emergenti evidenze sperimentali sottolineano il ruolo cruciale dell’eme-ossigenasi-1 (HO-1) come sistema integrale, inducibile e redox-sensibile, responsabile della resistenza cellulare allo stress. L’induzione dell’HO, che avviene assieme all’induzione delle altre Hsps durante varie condizioni fisiopatologiche, attraverso la generazione della molecola vasoattiva, il monossido di carbonio, e della bilirubina, potente antiossidante, rappresenta un sistema protettivo potenzialmente attivo contro il danno ossidativo cerebrale (286,287). Quindi, l’induzione delle Hsps è utilizzata dalla cellula nei processi di riparazione a seguito di diversi danni, allo scopo di prevenire il danno causato dall’accumulo di proteine, che hanno perso la

propria funzionalità. Inoltre, recentemente questo sistema è stato considerato come marker biologico per la *rivelazione* di condizioni di stress fisiologico e fisiopatologico (288).

Negli ultimi anni, c'è stato un crescente interesse nell'identificare nuove strategie farmacologiche per potenziare i meccanismi di difesa attraverso l'attivazione multipla dei geni di difesa antiossidante. Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato una forte relazione tra assunzione di cibo, incidenza e gravità di malattie croniche, portando alla conclusione che prodotti chimici derivanti dalla dieta, attraverso la modulazione dell'espressione dei geni target, possono influire sul bilancio salute-malattia, giocando un ruolo chiave nell'insorgenza, progressione, e gravità di patologie croniche (289).

L-Acetil-carnitina è stata proposta come agente terapeutico in diversi disordini neurodegenerativi (17, 254). È stato riportato che questo composto, nei primati non umani, previene il danno neurologico indotto dal metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) nella sostanza nera, l'aumento della respirazione cellulare, il potenziale delle membrane mitocondriali ed i livelli di cardiolipina negli epatociti di ratti di 24 mesi di età(17). Questi dati suggeriscono che il sistema della carnitina è coinvolto nei processi di riparazione e di stabilizzazione delle membrane e nel metabolismo di disgregazione dell'acil-CoA, come l'acilcarnitina (178). L'L-acetil-carnitina, così come la carnitina, attenua il danno neuronale prodotto dall'acido 3-nitropropionico, dal rotenone e dal MPTP (17). Inoltre, la LAC induce un recupero più rapido dei livelli di ATP, PCr e lattato nei ratti dopo ischemia.

I risultati di questa ricerca hanno dimostrato che in cellule di neuroblastoma umano (SH-SY5Y) sottoposte a stress ossidativo, il trattamento con la LAC non solo aumenta la percentuale di vitalità cellulare,

ma induce anche l'attivazione delle "heat shock proteins": Hsp-70 e HO-1 rispetto alle cellule sottoposte a stress ossidativo.

Le Hsp-70 sono codificate nel nucleo, ma risiedono sia nel citosol che nei mitocondri (17). Le Hsp-70 in condizioni normali formano il complesso delle chaperonine, che è implicato nel ripiegamento e nell'asseblaggio delle proteine all'interno del citosol, ma anche negli organelli cellulari come il reticolo endoplasmatico e i mitocondri (290). La maggior parte delle proteine mitocondriali sono sintetizzate nel citosol, ma possono essere trasferite negli organelli nello stato non ripiegato (290). Durante la traslocazione le proteine interagiscono con le Hsp-70. Il legame ATP-dipendente e il rilascio delle Hsp-70 fornisce maggior forza per il trasporto completo dei polipeptidi all'interno della matrice mitocondriale.

La maggior parte dei polipeptidi sono rilasciati dalle Hsp-70 solubili; comunque, un sottoinsieme di polipeptidi aggregati possono essere trasferiti dalla Hsp-70 alla Hsp-60 durante il ripiegamento (291). Dovendo chiudere le interazioni funzionali tra questi due sistemi di chaperonine, è probabile che l'upregolazione delle Hsp-70 sia un sito target fondamentale per l'azione della LAC, che ristabilisce di conseguenza le funzioni del complesso mitocondriale. Questi risultati sperimentali dimostrano che anche la LAC gioca un ruolo cruciale nella regolazione dei vitageni.

Nell'insieme questi risultati confermano che la risposta cellulare allo stress può essere considerata come target per nuovi interventi terapeutici, e può essere focalizzata sulla capacità antiossidanti di alcuni componenti come i polifenoli nutrizionali. La L-carnosina con i suoi relativi peptidi e l'L-acetilcarnosina possono regolare il sistema dei vitageni in modo da limitare le conseguenze deleterie dello stress ossidativo e nitrosativo associato all'invecchiamento o ad altri disordini neurodegenerativi (292).

## SCI

Diversi studi hanno dimostrato che la formazione di specie reattive dell'ossigeno e del nitrogeno è coinvolta nel danno neuronale secondario nella SCI (293). In particolare è stato rilevato che il perossinitrito probabilmente contribuisce al danno neuronale secondario attraverso una via che determina modificazioni chimiche di proteine e lipidi cellulari (293). Per confermare il contributo patologico del perossinitrito al danno secondario nella SCI, è stata valutata la formazione di nitrotirosina nel danno tissutale. La formazione di nitrotirosina è stata inizialmente proposta come un marker relativamente specifico per la formazione endogena di perossinitrito "footprint" (294). Quindi, l'aumento di nitrotirosina è stato considerato come indicatore di "aumento di stress nitrosativo", piuttosto che uno specifico marker di generazione di perossinitrito. Queste ricerche sono state confermate dai risultati ottenuti in questo studio, in cui si dimostra una elevata espressione delle Hsp-70 nei topi SCI operati, in accordo con l'ipotesi che le Hsp-70 sono attivate da segnali di stress ossidativo e/o nitrosativo.

Nell'ultimo decennio sono stati condotti diversi studi per capire le funzioni biologiche che la carnosina e i relativi dipetidi hanno nel sistema nervoso centrale.

Dati sperimentali hanno riportato che la carnosina può agire come inibitore selettivo dell'attivazione della guanilatociclastasi NO-dipendente, suggerendo il suo utilizzo in differenti disordini associati con un'aberrante attività del sistema di segnale intracellulare: guanilatociclastasi-c-GMP NO-solubile (98). È stato anche dimostrato che la carnosina ed alcuni dei suoi analoghi sintetici contrastano il danno dipendente dal perossinitrito, come la nitratura della tirosina libera, l' $\alpha_1$ AP e le modificazioni LDL.

La carnosina è stata trovata nel cervello, nel cuore, nella pelle, nel muscolo, nei reni, ma anche in altri tessuti. È stata proposta come potenziale



trattamento per la malattia di Alzheimer (295), l'autismo (296), l'ischemia cerebrale (297), il morbo di Parkinson (298), la sindrome di Down (299), l'epilessia (300) e l'invecchiamento (301).

Nonostante numerosi dati suggeriscono che la carnosina e suoi relati dipeptidi abbiano proprietà antiossidanti ed effetti protettivi cellulari, diverse ricerche hanno suggerito che la carnosina è un neuroprotettore endogeno (297). Pubill et al. hanno dimostrato che la carnosina previene la gliosi indotta dalle metafetamine (91). Gallant et al. (302), ed introducendo la carnosina nella dieta dei ratti, hanno trovato che riduce la mortalità e migliora il comportamento durante il recupero nei ratti soggetti ad una comune occlusione dell'arteria carotide.

Questi risultati sperimentali hanno inoltre dimostrato che l'induzione delle Hsp-70 è ridotta nei topi Sci operati e trattati con D-carnosina, ma non in quelli trattati con L-carnosina. Questi differenti comportamenti della D-carnosina e dell'L-carnosina, possono essere attribuiti al loro differente andamento dell'idrolisi in vivo. Infatti, la D-carnosina non è idrolizzata dalla carnosinasi, infatti l'attività enzimatica, in vivo, potrebbe ostacolare l'L-carnosina, ma non la D-carnosina, che mostra quindi i suoi effetti protettivi dopo il danno al midollo spinale. I vitageni potrebbero quindi rappresentare importanti targets per nuove strategie terapeutiche. La modulazione dei pathways di stress cellulare e la ricerca di strategie neuroprotettive, mediante interventi di tipo farmacologico ed alimentare, potrebbe avere un ruolo fondamentale nel trattamento delle malattie neurodegenerative in generale.



DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA IN NEUROBIOLOGIA  
XXIII CICLO  
**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**  
SEDI CONSORZIATE: UNIVERSITÀ DI CATANIA, ROMA E PAVIA  
SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DI CATANIA

---

Dott.ssa Maria Monia Cavallaro

**ANTIOSSIDANTI NUTRIZIONALI E MEDICINA MITOCONDRIALE. RUOLO  
DEI VITAGENI NELLA CHEMOPREVENZIONE.**

**NUTRITIONAL ANTIOXIDANTS AND MITTOCHONDRIAL MEDICINE:  
ROLE OF VITAGENES AND CHEMOPREVENTION.**

—————  
TESI DI DOTTORATO  
—————

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. ROBERTO AVOLA

TUTOR:

Chiar.mo Prof. VITTORIO CALABRESE

COTUTOR:

Chiar.ma Prof.ssa MARIA TERESA CAMBRIA

---

**INDICE**

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>106</b>
<b>3 MITOCONDRI ( MITOCHONDRIAL)</b>	
- <i>Struttura e funzioni</i>	6
- <i>Structure and function</i>	109
- <i>Medicina Mitocondriale</i>	8
- <i>Mitochondria-based intervention medicine</i>	111
<b>4 EQUILIBRIO REDOX E SISTEMI DI DIFESA ANTIOSSIDANTE</b>	
<b>REDOX BALANCE AND ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEMS</b>	
- <i>Stress ossidativo</i>	10
- <i>Oxidative stress</i>	113
- <i>Specie Reattive dell'Ossigeno</i>	11
- <i>Reactive oxigene species (ROS)</i>	114
- <i>Tossicità dei ROS</i>	14
- <i>ROS Toxicity</i>	116
- <i>Meccanismi di difesa antiossidante</i>	18
- <i>Mechanism of antioxidant defence</i>	120
- <i>Meccanismi di difesa “ Heat Shock Response”</i>	25
- <i>Defence mechanism “heat shock response”</i>	127
<b>3. SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>23</b>
<b>3. AIM OF THE RESEARCH</b>	<b>144</b>
<b>4. MATERIALI E METODI</b>	<b>49</b>
<b>4.MATERIAL AND METHODS</b>	<b>148</b>
<b>5. RISULTATI</b>	<b>70</b>
<b>5. RESULTS</b>	<b>166</b>
<b>6. DISCUSSIONE</b>	<b>85</b>
<b>6. DISCUSSION.....</b>	<b>178.</b>
<b>7 FIGURE</b>	<b>199</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>251</b>

## **-INTRODUCTION-**

Life is the interplay between structure and energy, yet the role of energy deficiency in human disease has been poorly explored by modern medicine (1). Ever since Luft reported the first mitochondrial disease in the 1960s, increasing numbers of diseases related to the disorders of the cellular “batteries” have been recognized and studied in basic as well as clinical research platforms (2)

Given the large increase in metabolic and degenerative diseases over the past 50 years, interest in mitochondria has greatly increased.

This is also due to the discovery of the important role it plays in diseases of great demographic impact. In fact, mitochondrial dysfunction have been reported in a large number of diseases not only neurological, neuromuscular and neurodegenerative(2), but also in common diseases such as diabetes, cancer, and cardiovascular disease

Although this organelle was previously known and studied mainly by biochemists, it has become a fundamental part of many molecular biology studies, involving pathologists, geneticists, and demographers. Therefore we are seeing the emergence of a veritable "Mitochondrial Medicine" (1)

As the name suggests, mitochondrial diseases are a series of clinical disorders whose etiology is either directly or indirectly related to mitochondrial pathologies including DNA mutation, mitochondrial redox perturbation, mitochondrial energy production defects and so forth (2).

Harman in 1972 first proposed that mitochondria may have a central role in the process of aging. According to this theory, free radicals generated through mitochondrial metabolism can act as causative factor of abnormal function and cell death (3).

Numerous experimental data shows evidence of the involvement of oxidative stress in neurodegenerative disorders (4)

Moreover, several conditions including protein, lipid or glucose oxidation disrupt redox homeostasis and lead to accumulation of unfolded or misfolded proteins in the aging brain. Alzheimer's and Parkinson's diseases or Friedreich ataxia are neurological diseases sharing, as a common denominator, production of abnormal proteins, mitochondrial dysfunction and oxidative stress, which contribute to the pathogenesis of these so called "protein conformational diseases"(5)

Mitochondrial dysfunction to play a key role in the neurodegenerative disorders.

Mitochondrial damage is responsible for the alteration of the respiratory chain as demonstrated in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and Huntington's disease.

Such defects in respiratory complex activities, possibly associated with oxidant/antioxidant balance perturbation, are thought to underlie defects in energy metabolism and induce cellular degeneration (6).

A mutation, whether inherited or acquired, leads to impaired electron transport chain (ETC) functioning. Impaired electron transport, in turn, leads to decreased ATP production, increased formation of toxic free radicals, and altered calcium homeostasis. These toxic consequences of ETC dysfunction may sustain further mitochondrial damage, including oxidation of mitochondrial DNA, proteins, and lipids, and opening of the mitochondrial permeability transition pore, an event associated with cell degeneration and death (7).

Mitochondria are the cell's most significant source of oxidants, and in vitro studies have indicated that approximately 1–2% of electron flow through the ETC results in the univalent generation of superoxide (3).Moreover, various toxins in the environment can injure mitochondrial enzymes, leading

to increased generation of free radical that over the life span would eventually play a major role in aging.

During the last few years, cellular oxidant/antioxidant balance has become the subject of intense study, particularly by those interested in brain aging and in neurodegenerative mechanisms (8).

As one of the main intracellular redox systems involved in neuroprotection, the vitagene system is emerging as a neurohormetic potential target for novel cytoprotective interventions. Vitagenes encode for cytoprotective heat shock proteins (Hsp) Hsp70 and heme oxygenase-1, as well as thioredoxin reductase and sirtuins.

Nutritional studies show that ageing in animals can be significantly influenced by dietary restriction.

Reducing energy intake by controlled caloric restriction or intermittent fasting increases lifespan and protects various tissues against disease. Genetics has revealed that ageing may be controlled by changes in intracellular NAD/NADH ratio regulating sirtuin, a group of proteins linked to aging, metabolism and stress tolerance in several organisms.

Consistently, the neuroprotective roles of dietary antioxidants including curcumin, acetyl-L-carnitine and carnosine have been demonstrated through the activation of these redox-sensitive intracellular pathways. Although the notion that stress proteins are neuroprotective is broadly accepted, still much work needs to be done in order to associate neuroprotection with specific pattern of stress responses (5).

## **Mitochondria**

### *Structure and Function*

Mitochondria are intracellular ovoid or spheroid organelles with a transverse diameter of 0.1–0.5  $\mu\text{m}$  and a variable length. According to the endosymbiont hypothesis mitochondria derive from prokaryotes, which were integrated in nucleus containing cells. The number of mitochondria per cell ranges from none (erythrocytes) to 10 000 (striated muscle cell). The average number is 500–2000/cell. The number of mitochondria within a cell increases with the amount of substrate and oxygen utilization a particular cell requires. In the muscle cell they reside between the myofibrils, subsarcolemmally, near the nucleus or near the motor endplate (9). Mitochondria are characterized by two membranes, the inner and the outer membranes, with two compartments separated by the inner membrane. Cristae are invaginations of the inner membrane.

The matrix, surrounded by the folding of the inner membrane. Within the matrix a large number of enzymes and other proteins and peptides, including respiratory chain complexes, DNA-polymerases, chaperones (heat shock proteins), mRNAs, tRNAs, and the mtDNA are located. The outer mitochondrial membrane is permeable to small molecules and ions, which move through transmembrane channels formed by a family of integral membrane proteins called porins. Voltage-dependent anion channels are the potentialsensitive porins of the outer membrane that allow metabolite exchange between mitochondria and the cytoplasm. The inner membrane is impermeable to  $\text{H}^+$  and this property provides the basis of mitochondrial energy transduction. Chemical species as ions and small molecules that cross





tRNA genes. Other gene symbols are defined in the text. Arrows followed by continental names and associated letters on the inside of the circle indicate the position of defining polymorphisms of selected region-specific mtDNA lineages. Arrows associated with abbreviations followed by numbers around the outside of the circle indicate representative pathogenic mutations, the number being the nucleotide position of the mutation. Abbreviations: DEAF, deafness; MELAS, mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes; LHON, Leber hereditary optic neuropathy; ADPD, Alzheimer and Parkinson disease; MERRF, myoclonic epilepsy and ragged red fiber disease; NARP,

Unlike nDNA, mtDNA coding sequences have no introns (93% are coding compared with 5% in the nuclear genome), mtDNA is not interwoven with histones, has no effective repair system and uses a variant genetic code. MtDNA depends on nDNA for its enzymes of replication, transcription, translation and repair. During their development mitochondria divide and proliferate under nuclear control. (13). In mammals all mitochondria are inherited from the mother(14).

### ***Mitochondria-based interventional medicine***

Mitochondrial medicine is developing rapidly with the increasingly deepened appreciation of mitochondrial diseases. Mitochondria-based interventional medicine, though a relatively nascent area, takes great benefit from the expanding knowledge on the mitochondria-related molecular basis of mitochondrial diseases. The current mitochondrial medicine strategies can be divided into two categories: 1) preventing on-going mitochondrial dysfunction in diseases with determined mitochondria-related etiology; this is

of essential significance for the treatment of inherited mitochondrial diseases such as Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) (15); and 2) manipulating on diseases with prevalent mitochondrial defects, for example sporadic neurodegenerative diseases like Parkinson's disease (16). Strategies of mitochondria-based interventional medicine is springing up, aiming at prevalent mitochondrial pathologies including perturbed cellular bioenergetics, oxidative stress, mtDNA mutations, impaired mitochondrial calcium handling capacity, mitochondria-originated apoptosis, and defected mitochondrial behavior.

## **REDOX BALANCE AND ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEMS**

### ***Oxidative Stress***

The overproduction of free radicals, molecular species that are continuously produced in small quantities in our bodies, is an important cause of cellular aging and plays a role in the pathogenesis of a wide variety of pathological states (17). Under normal conditions, cells have efficient antioxidant defense systems. When the rate of generation of free radicals exceeds the capacity of antioxidant defenses, a state of "oxidative stress" is established which is the "primum movens" for the consequences that can lead to irreversible cell damage(18).

Numerous experimental data shows the involvement of oxidative stress in the mechanism of aging and neurodegeneration(19).

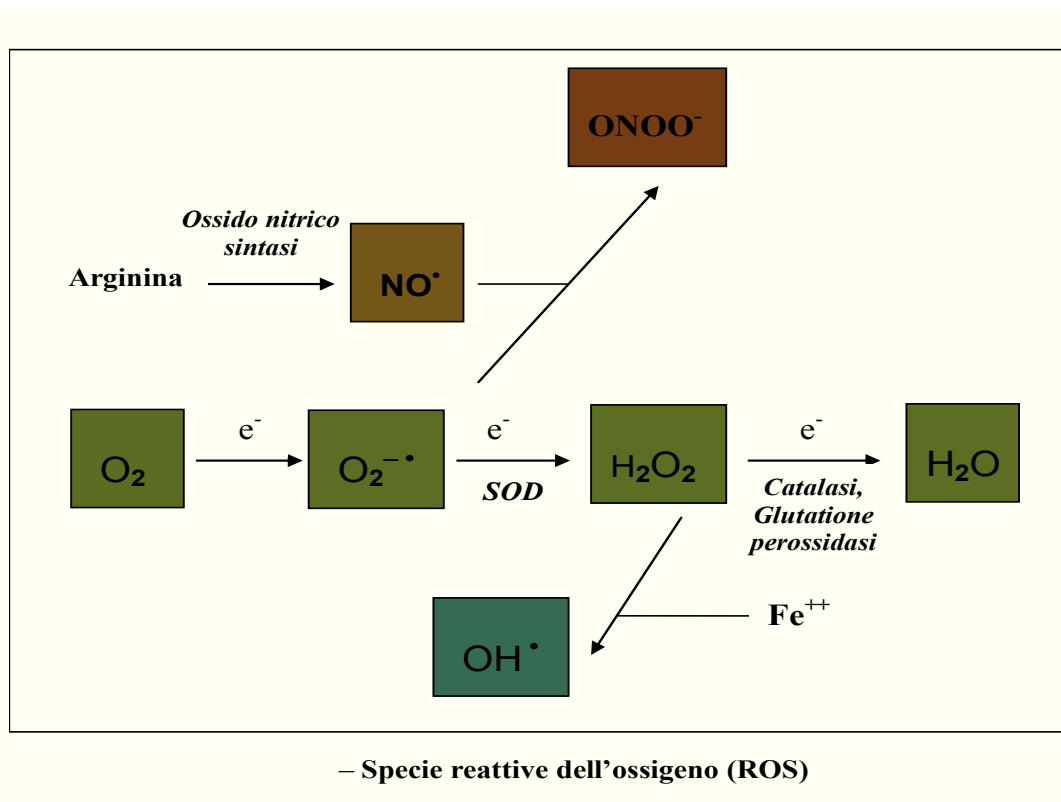
Oxidative stress is therefore characterized by an imbalance of the redox state of oxidants/antioxidants that may lead to altered cellular function and oxidative damage of fundamental biological macromolecules like protein (protein carbonyls, nitration of tyrosine), lipids (products of lipid peroxidation) and nucleic acids(20,21).

Oxidative stress is induced by both exogenous and endogenous sources (22). The first include drugs and toxic chemicals that change the balance of oxidants / antioxidants in favour of oxidation; the latter includes overproduction of reactive oxygen intermediates by the mitochondrial electron transport chain. One of the main causes of oxidative stress is therefore the excessive release of reactive oxygen species (ROS).

### ***Reactive oxygen species (ROS)***

ROS are defined as molecular entities that react with cellular components, causing harmful effects on their functions. ROS include both free radicals (containing highly reactive unpaired electrons) such as superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), nitric oxide ( $NO^{\cdot}$ ) and hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) and other molecular species, such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and peroxynitrite ( $ONOO^-$ ).

The majority of cellular ROS are generated during the incomplete metabolic reduction of oxygen to water (see figure below).



The oxygen molecule is a biological paradox in which one side is an essential molecule for aerobic life, the other a biological hazard due to its high toxicity. In fact, the oxygen that is taken from the external environment through respiration, is required in mitochondrial respiration for the production of energy in the form of ATP using a complex process that is called "oxidative phosphorylation"; oxygen, acting as a final acceptor of electrons

removed from the molecules and combines with protons removed from the same, which allows complete oxidation to carbon dioxide and water molecules of various kinds (glycidol, fatty acids, amino acids, etc..) with release of all the energy they contain.

In a resting state, 2-4% of oxygen uptake by cells is converted into reactive oxygen species which are defined as free radicals, highly reactive molecules with an unpaired electron, which subtract the electron they need to restore the even number of electrons in their orbital, from the molecules they are in contact with (23). The activation of molecular oxygen can usually be done in two ways: one by using electrons and energy (17). The free radicals which can be formed during the sequential reduction mono electronics  $O_2$  are the superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide (HOOH) hydroxyl radical ( $OH^\cdot$ ).

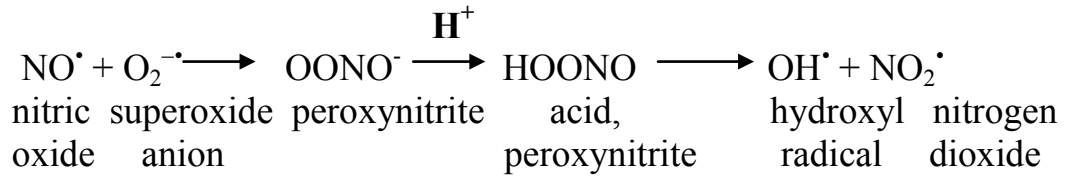
During activation energy, it takes 22 kcal of energy because you have electronic transitions in molecular orbital of oxygen leading to the formation of singlet oxygen ( $O_2$ ) which is not a radical, as there is an unpaired electron, but has a strong oxidizing ability, and, for degradation, generates superoxide anion ( $O_2^-$ ).

Ionizing radiation, photosensitizing agents, heat, death of a cell entropic phenomena all thermodynamically favor the release of the amount of energy above this threshold and, therefore, sufficient for these electronic transitions take place (23).

Excessive formation of  $NO^\cdot$ , a physiologically important molecule for the regulation of vascular tone and immunomodulatory processes, can generate radical forms when associated with a concomitant overproduction of superoxide anion (24).

The endothelium seems to continuously produce small amounts of superoxide that can react with nitric oxide (both free radicals) to form nitrate ions, a product which is not radical. For this reason, variations in the

production of nitric oxide and superoxide by the endothelium may represent a mechanism of regulation of vascular tone. The peroxyxynitrite anion, degrading, form the hydroxyl radical (24,25).



If two free radicals react with each other, they cancel each other out, especially when a radical reacts with a free radical molecule, it produces a new free radical and triggers a chain reaction until it forms a stable compound. It then passes from the stage of "generation" to that of "propagation" of the free radical (23).

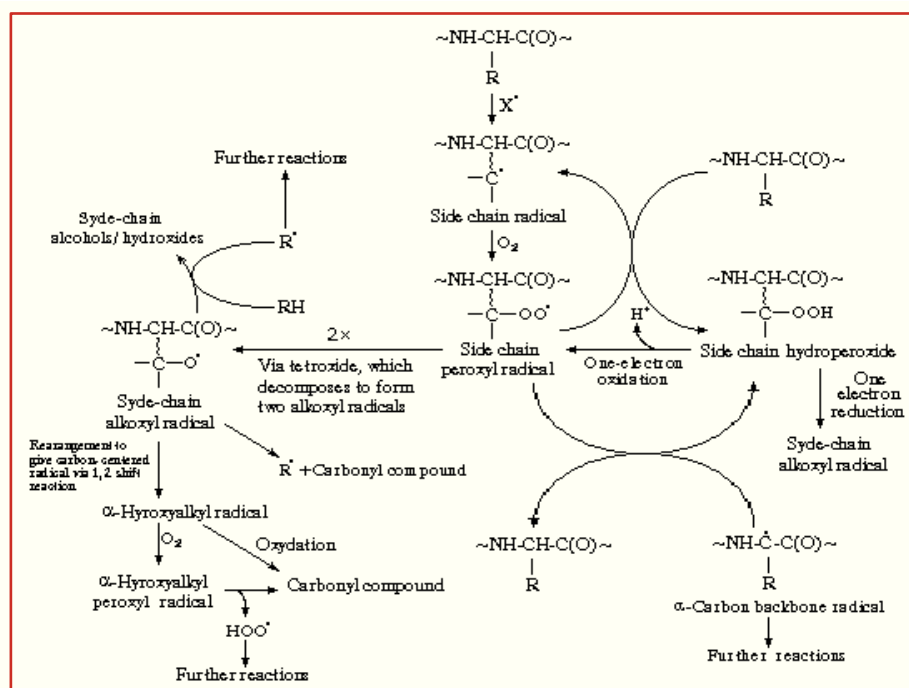
The formation of oxygen radical species is thus an occurrence which cannot be eliminated in the cellular environment.

### ***ROS Toxicity***

Certain clinical situations or the intensification of external factors such as environmental pollution, smoking, a diet rich in fats, alcohol abuse, solar radiation, the use of certain medications, physical and mental stress, are all conditions generally associated with the overproduction of free radicals.

When the generation of free radicals exceeds the capacity of detoxifying antioxidant defenses, it establishes a condition of "oxidative stress". This represents a risk to the structural and functional integrity of important molecules such as DNA, proteins and lipids (22).

Free radicals and in particular the  $\text{OH}^\cdot$ , which is the most reactive free radical, can react with various molecules, dramatically changing both the chemical state and profoundly altering the function. The proteins can be oxidized at the level of sulfhydryl groups through a process that involves the deactivation of channel proteins, receptor or important enzyme activities (26,27); for example, enzymes such as phosphofructokinase, complex I and complex IV of mitochondrial respiratory chain are inactivated with severe deterioration of the cell's ability to supply energy. The calcium pump is inactivated with a consequent tendency to maintain high levels of calcium citosolubile



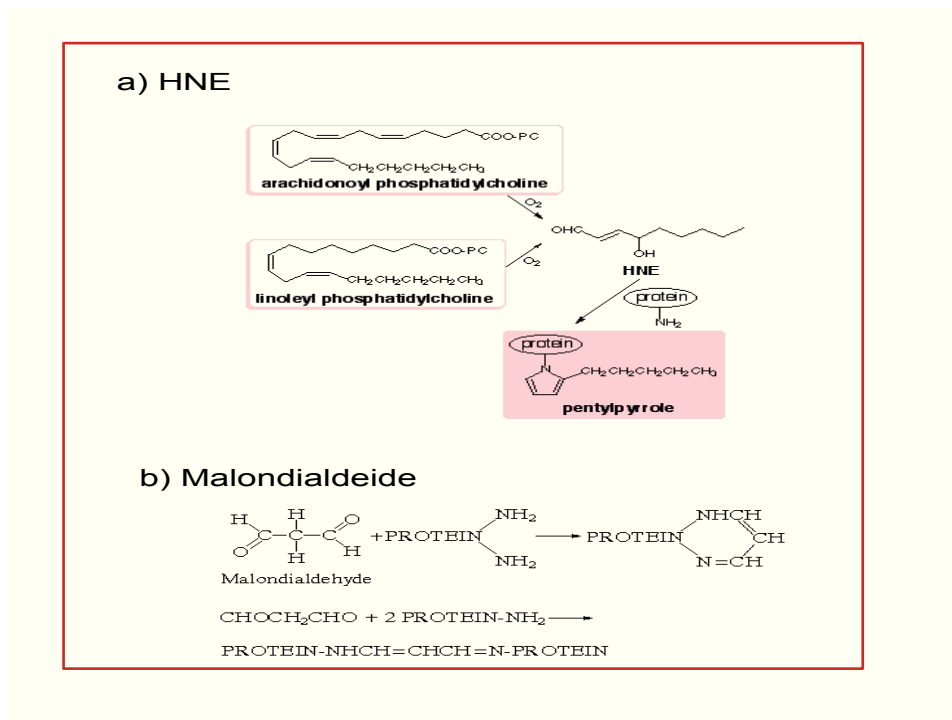
## Direct oxidation of side chains of amino acid residues with the formation of carbonyl

Nucleic acids are sensitive to free radical attack at both of the bases of the pentose resulting in rupture of the propellers with the formation of modified bases such as 8-hydroxy-guanine and alteration of the genetic code (23).

The best known harmful effect of ROS is lipid peroxidation a chain reaction that leads to the formation of lipid peroxides and hydroperoxides from the oxidation of a methylene bridge at the level of a polyunsaturated fatty acid of membrane lipids such as arachidonic acid and linolenic acid. The lipidroperossidi tend to move from the hydrophobic membrane to the surface leading to a disorganization of the structure of the membrane itself.

Consequently it causes irreversible damage to the morfofuctionality of intracellular and cellular membranes or lipoproteins (28).





## - Adduct formation between the protein and lipid peroxidation products

The continued against oxidative damage important molecules like DNA, proteins and lipids, elicited by activated oxygen species and of NO, is considered, in light of current experimental and clinical evidence, the most important cause of fisiopatogenetiche and biochemical changes observed during aging of the CNS including neurodegenerative disorders (24).

Several lines of evidence suggest that accumulation of oxidative molecular damage is a causal factor in senescence.

Among the correlative evidence supporting the involvement of oxidative stress are the following: (a) oxidative molecular damage to DNA and proteins increases exponentially with age, and concomitantly, the rates of mitochondrial O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation as well as the susceptibility of tissues to experimentally induced oxide. Among the correlative evidence supporting the involvement of oxidative stress are the following: (b) experimental regimens that extend the lifespan, such as caloric restriction in mammals and reduction of metabolic rate in insects, decrease the accumulation rates of

oxidative damage; (c) mitochondria make two rather contradictory contributions to cell survival. The classically recognized function is the synthesis of ATP for energizing endergonic reactions, the other is generation of reactive oxygen species which may compromise the long-term survival of cells and constitute a major underlying cause of the aging process. Indeed, these two rather conflicting functions are part of the same process, namely mitochondrial respiration.

The alteration in the redox and mitochondrial dysfunction that follows, is involved in so many disease states neuropatogenesi including neurodegenerative disorders such as multiple sclerosis (MS), Parkinson's disease (PD) the Alzheimer's disease, (AD) and the aging (29).

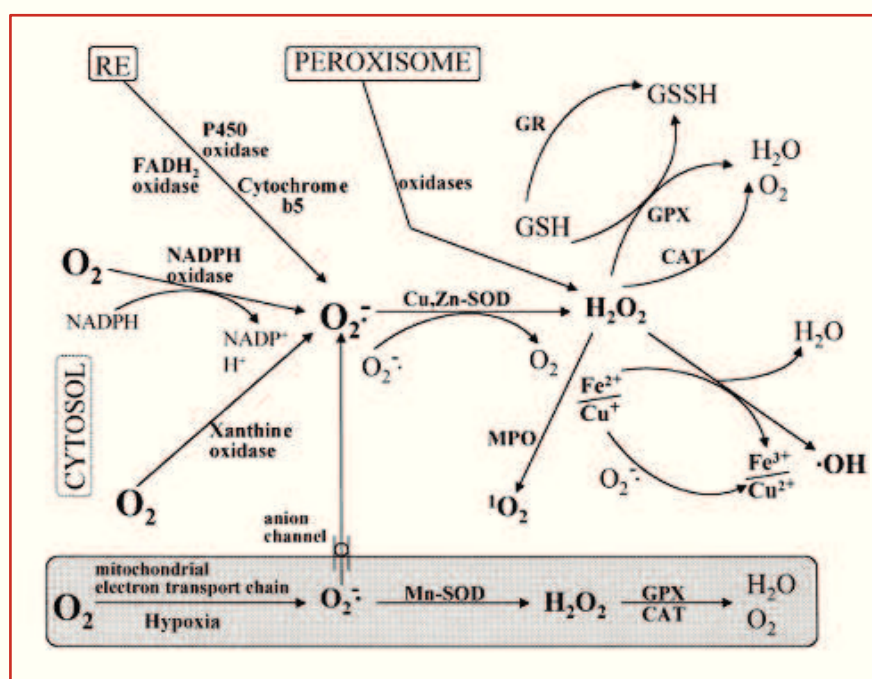
CNS has a large potential oxidative capacity (30) due to the high level of tissue oxygen consumption. However, the ability of the brain to withstand oxidative stress is limited because of: (a) a high content of easily oxidizable substrates, such as polyunsaturated fatty acids and catecholamines; (b) relatively low levels of antioxidants such as glutathione and vitamin E and antioxidant enzymes (such as glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase); (c) the endogenous generation of reactive oxygen free radicals via several specific reactions; (d) the elevated content of iron in specific areas of the human brain, such as globus pallidus and substantia nigra (SN), while cerebrospinal fluid has very little iron-binding capacity owing to its low content of transferrin; (e) CNS contains non-replicating neuronal cells which, once damaged, may be permanently dysfunctional or committed to programmed cell death (apoptosis).

Numerous experimental evidence lead to the conclusion that the dysfunction at the level of cellular energy metabolism is an important factor in the neurotoxicity mediated by NO and that the cellular content of thiols is crucial in determining the sensitivity of cells to oxidative stress and nitrosative (31).

### *Mechanisms of Antioxidant Defence*

In normal conditions, there is a steady-state balance between pro-oxidants and antioxidants which is necessary to ensure optimal efficiency of antioxidant defenses during normal cellular metabolism, can adequately deal with all the free radicals produced (7).

In addition, recent studies show that a minimum amount of free radicals, which until now have been considered only due to aging, is a necessary condition for optimal cell function since it leads to greater efficiency in defense systems and increased cell survival (31).



### **-Intracellular production of reactive oxygen species (ROS) and defense mechanisms**

In the cell, on the front of the insult oxidative level of the cytoplasm, mitochondria and also in the extracellular fluid exist efficient mechanisms of defense antioxidant enzymatic and non enzymatic

In the first case of cytoprotective enzymes (Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase )

called "scavengers", that act as "scavengers" against free radicals tending to remove them as soon as formed or to prevent its formation. In the second case of anti-oxidants can react with free radicals, abducting and neutralizing them, and therefore able to block the series of reactions of lipid peroxidation, thus preventing the action is detrimental to the propagation of free radicals, among them include: molecules able to bind the singlet O<sub>2</sub> (β-carotenes, retinoids), inhibitors of xanthine oxidase (allopurinol) low molecular weight molecules, both water-soluble: as ascorbic acid (vitamin C) and glutathione involved in blood plasma and in the cytosol, both soluble such as α-tocopherol (vitamin E), bilirubin, uric acid, estrogen instead exert their action in the heart of the hydrophobic cell membranes or plasma lipoproteins (23).

In recent years, since oxidative stress has been found at the base of some, if not all, aspects of neurodegeneration, numerous experimental investigations have been conducted in order to reduce the effects of oxidative stress through the use of scavengers of free radicals.

Some nutritional compounds have been identified among these

There are two general classes of antioxidants, endogenous and exogenous. Among the former are the tripeptide glutathione (GSH), various vitamins, and products of reactions catalyzed by enzymes that are upregulated in response to oxidative stress, e.g., bilirubin from heme oxygenase and products of antioxidant response elements (ARE) (32). Among the exogenous, nutritionally derived antioxidants are different classes of molecules: those moieties that increase endogenous GSH levels or otherwise have reactive SH functionalities; vitamins; and phenolic and polyphenolic compounds (33,34)

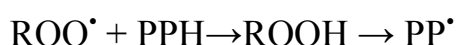
The *tri-peptide glutathione* ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine) is an endogenous antioxidant of great importance. Glutathione (GSH) is required for the maintenance of the thiol redox status of the cell, protection against oxidative damage, detoxification of endogenous and exogenous reactive metals and electrophiles, storage and transport of cysteine, as well as for protein and DNA synthesis, cell cycle regulation and cell differentiation (35). Glutathione and glutathione-related enzymes play a key role in protecting the cell against the effects of reactive oxygen species.

The key functional element of glutathione is the cysteinyl moiety, which provides the reactive thiol group. Glutathione is the predominant defense against reactive oxygen species (ROS), which are reduced by GSH in the presence of GSH peroxidase. As a result, GSH is oxidized to GSSG, which in turn is rapidly reduced back to GSH by GSSG reductase at the expense of NADPH. The thiol-disulfide redox cycle also aids in maintaining reduced protein and enzyme thiols. Without a process to reduce protein disulfides, vulnerable cysteinyl residues of essential enzymes might remain oxidized, leading to changes in catalytic activity. Glutathione also aids in the storage and transfer of cysteine as well. Cysteine autoxidizes rapidly into cystine producing toxic oxygen radicals. To avoid the toxicity of cystine, most of the nonprotein cysteine is stored in glutathione. In addition to protection against ROS, glutathione is an excellent scavenger of lipid peroxidation products such as HNE and acrolein, both of which have been found to bind proteins inhibiting their activities. Glutathione also reacts with saturated carbon atoms (epoxides), unsaturated carbon atoms (quinones, esters), and aromatic carbon atoms (arylnitro compounds). This detoxification involves nucleophilic attack by GSH on an electrophilic carbon. This reaction can occur spontaneously, but most often is catalyzed by glutathione S-transferase.

Glutathione also forms metal complexes via nonenzymatic reactions. GSH functions in the storage, mobilization and delivery of metal ions between ligands, in the transport of metal across cell membranes, as a source of cysteine for metal binding, and as a reductant in redox reactions involving metals (35). The sulfhydryl group of the cysteine moiety of GSH has a high affinity for metal ions such as mercury, silver, cadmium, arsenic, lead, gold, zinc, and copper, forming a thermodynamically stable complex that can be eliminated from the body. Thus, means of increasing glutathione may prove beneficial against oxidative stress.

*Vitamin E*, a phenolic compound, acts as an antioxidant by scavenging free radicals via the phenolic H-atom. The reactions of vitamin E, vitamin C, and glutathione may be linked by various recycling pathways, thereby increasing efficiency of these moieties against oxidative stress.

*Polyphenols* are natural substances ubiquitously present in fruits and vegetables, as well as, beverages obtained from plants such as tea, red wine and olive oil. Flavonoids compose the largest group of polyphenols. Their skeletal structure consists of an aromatic ring condensed to a heterocyclic ring, attached to a second aromatic ring. Flavonoids are mainly divided into: anthocyanins, glycosylated derivative of anthocyanidin, present in colorful flowers and fruits, and anthoxantins, colorless compounds further divided in several categories including flavones, flavans, flavonols, flavanols, and isoflavones. The remarkable antioxidant activity of these compounds is conferred by the numerous phenolic hydroxyl groups on the aromatic ring. The rapid donation of a hydrogen atom to lipid peroxy radical results in the formation of the polyphenol phenoxy radical (PP<sup>•</sup>) according to the reaction



that can be stabilized by further donation of another hydrogen or by reacting with another radical. In addition, flavonoids present efficient iron chelating activity, for which the 3-OH is important (36). The physiological

effects of flavonoids are particularly significant in those pathologies where the oxidative stress hypothesis is accepted and supported by experimental data, such as AD. *In vitro*, flavonoids are capable of scavenging superoxide anions (37) and hydroxyl radicals (38). Once ingested, these compounds are capable of elevating the redox and antioxidant level (39). In red blood cells, polyphenols enhance cell resistance to oxidative insult (40), as well as inhibit LDL oxidation in plasma (41). The importance of these molecules in protecting cells from oxidative stress goes beyond the simple radical oxygen species (ROS) scavenging properties. In a recent study on neuronal Cells (42), three different mechanisms of protection have been identified: Flavonoids can prevent cell death after glutamate injury by scavenging radicals, maintaining the correct glutathione levels and inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  influx, which represents the last step in the cell death cascade. These properties, together with anti-inflammatory properties attributed to some polyphenols (43), renders this class of compounds suitable for application where oxidative stress, together with inflammation and antioxidant defense depletion take place, such as AD

*Spices and herbs* often contain phenolic substances with potent antioxidative and chemopreventive properties (44). Spices form an important class of food adjuncts and are used to enhance the sensory quality of food. Recent studies show that some of the biochemical effects of spices are due to their active principles. Turmeric (*Curcuma longa* Linn, family: *Zingiberaceae*) has been used as a coloring agent and food additive in Indian culinary preparations from time immemorial (45).

The active antioxidant principle in *Curcuma longa* has been identified as curcumin (diferuloyl methane). It is generally assumed that the phenol moiety is responsible for antioxidant properties of any plant phenolic compound. Consequently, the free radical chemistry of curcumin (an *o*-methoxyphenol derivative) has focused on its phenol ring (46). The possible involvement of the  $\beta$ -diketone moiety in the antioxidant action of curcumin

has been considered and, as recently shown (47), the H-atom donation from the  $\beta$ -diketone moiety to a lipid alkyl or a lipid peroxy radical has been reported as the potentially more important mechanism underlying its antioxidant action.

Similar to the well-known synergism between lipid soluble antioxidant action (48) might position itself at the border of the cell membrane adjacent to the aqueous milieu, in short “pops out” of the membrane to be repaired by water soluble antioxidant, such as catechins or ascorbate. Curcumin, as a powerful lipid soluble antioxidant, positions itself within the cell membrane, where it intercepts lipid radicals and becomes a phenoxyl radical. Being more polar than curcumin, phenoxyl radical travels to the membrane surface. Owing to the high reduction potential of phenoxyl curcumin radical (0.8 V, at physiological pH 7), this allows the curcumin intermediate to be easily repaired by electron donors with favorable oxidation potential, such as epigallocatechin gallate (0.43 V), catechin (0.55 V), or vitamin C (0.28 V). Such electron and associated proton transfer reaction will maintain optimal concentrations of curcumin at expense of water soluble antioxidants, in spite of its fast turnover and low physiological uptake. Moreover, curcumin free radicals can also react with each other or with other free radicals forming, either stable products such as curcumin dimers, vanilin and ferulic acid (49) or, through a peroxy linkage at the 3' position of the curcumin phenolic ring, coupling products which generate, via intramolecular Diels-Alder

reaction, non radical stable compounds (50). Curcumin contains two electrophilic  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl groups, which can react with nucleophiles such as glutathione (51). By virtue of its Michael reaction acceptor function and its electrophilic characteristics, curcumin and several other polyphenolic compounds have been recently demonstrated to induce the activities of Phase I and Phase II detox system (52,53), e.g., inhibition of COX-1 and COX-2 enzymes (54) and stimulation of glutathione-S-transferase



(55). In addition to its ability to scavenge carcinogenic free radicals (56), curcumin also interferes with cell growth through inhibition of protein kinases. Although the exact mechanisms by which curcumin promotes these effects remains to be elucidated, the antioxidant properties of this yellow pigment appear to be an essential component underlying its pleiotropic biological activities. Of particular interest is the ability of curcumin to inhibit lipid peroxidation and effectively to intercept and neutralize ROS (superoxide, peroxy, hydroxyl radicals) (57) and NO-based free radicals (nitric oxide and peroxynitrite) (58). In this regard, curcumin has been demonstrated to be several times more potent than vitamin E (59).

It should be noted however though most of the cytoprotective enzymes is localized in the intracellular antioxidant agents are located within both intra-and extracellular (7).

### ***Defense mechanism "Heat shock response"***

Increasing evidence demonstrates that oxidative stress alters the expression of antioxidant enzymes (60) and enhances expression and/or DNA binding of numerous transcription factors, including AP-1, fos, jun, myc, erg-1, SAPK and NFkB(61).

Moreover, it is well known that brain cells are continually challenged by conditions which may cause acute or chronic stress.

To adapt to environmental changes and survive different types of injuries, eukaryotic cells have evolved networks of different responses that detect and control diverse forms of stress. (62). One of these responses, known as the heat shock response, has attracted a great deal of attention as a universal fundamental mechanism necessary for cell survival under a wide variety of toxic conditions.

In mammalian cells, the induction of the heat shock response requires the activation and translocation to the nucleus of one or more heat shock

transcription factors that control the expression of a specific set of genes, termed vitagenes(63), encoding cytoprotective heat shock proteins.

Recent studies have shown that the heat shock response contributes to establishing a cytoprotective state in a wide variety of human diseases, including ischemia and reperfusion damage, inflammation, cancer, as well as metabolic and neurodegenerative disorders.

The stress response determines the gene expression in response to environmental changes such as high temperatures, radiation, exposure to excitotoxins and other stressful conditions that lead to denaturation of proteins.

Thus, the induction of Hsps is not only an index of physiological stress, but is used by cells to repair processes but is used by cells to repair processes after the insults to prevent the damage resulting to the accumulation of these proteins denatured (64).

Hsps consist of both stress inducible and constitutive family members.

The constitutive form performs basic physiological functions. However, some of them are up-regulated by stress. The inducible form prevents the denaturation of proteins and assembly of abnormal polypeptides during exposure to stressful conditions. Denatured proteins induced stress protein. The 70 kDa family of stress proteins is one of the most extensively studied. Included in this family are HSC70 (heat shock cognate, the constitutive form), HSP70 (the inducible form, also referred to as HSP72) Another important family is HSP 32, or heme oxygenase (HO) There are three isoforms of heme oxygenase: HO-1, or inducible isoform; HO-2, or constitutive isoform; and the recently discovered HO-3.

Heme oxygenase-1 exerts protective role, by degrading the intracellular levels of prooxidant heme and by producing biliverdin, the precursor of bilirubin, this latter being an endogenous molecule with potent antioxidant

and antinitrosative features and also produces carbon monoxide, a molecule involved in regulating vessel active pathway of NO (65).

Increasing evidence suggests that the HO-1 gene is redox regulated and contains in its promoter region the antioxidant responsive element (ARE), similarly to other antioxidants that bind specific transcription factors Nrf2 as sensitive to the alteration or NFkB redox balance; in fact, nitrosative stress and depletion of GSH up-regulate the protein

It was seen that the cells overexpressing the Hsps are resistant to several types of oxidizing agents and to the heat shock; the Hsps play a protective role against oxidative damage to DNA (66). The experimental evidence that: a) inhibition of antioxidant defenses increases the susceptibility to the heat shock, b) the Hsps confers resistance to oxidative stress (67); c) the induction of Hsp-70, suggests, inhibited by antioxidant compounds, a correlation between oxidative stress mechanisms and the induction of Hsps. Inoltre, l'NO ha un ruolo nell'induzione delle Hsp70 (68).

The *thioredoxin* (Trx) system (Trx and Trx reductase), has received a considerable attention in the last years, as a stress responsive gene, redox in light of new experimental evidence, is a leading member of the ubiquitous multifunctional redox regulation of cell redox (69).

Trx is a ubiquitous thiol oxidoreductase system that regulates cellular redox balance and constitute a family of proteins all of which have a conserved catalytic site (Cys-Gly-Pro-Cys) which undergoes reversible oxidation of the cysteine pair while reducing disulfide bridges of various proteins (70). The thioredoxin has evolved similar to a protein chaperone ensuring the maintenance of the structure dithiol / disulfidrilica biological function of proteins In fact, scientific evidence shows that Trx binds to specific proteins, modulating the structural conformation

The thioredoxin system, originally identified in *Escherichia coli*, in 1964, as a hydrogen donor for ribonucleotide reductase required for DNA

synthesis, plays a key role in cell function by limiting oxidative stress directly via antioxidant effects and indirectly by protein–protein interactions (71).

It is well established that, in mammals, cellular redox regulation of many processes is provided by the cooperation between the Trx and glutathione systems (72).

In fact, Trx and GSH systems are involved in a variety of redox-dependent pathways such as supplying reducing equivalents for ribonucleotide reductase, and peptide methionine sulfoxide reductase, the latter being involved in antioxidant defence and regulation of the cellular redox state (70).

Therefore, Trx and GSH form a powerful system controlling redox regulation of gene expression, signal transduction, cell proliferation, protection against oxidative stress, anti-apoptotic functions, growth factor and co-cytokine effects, as well as regulation of the redox state of the extracellular environment (73). The promoter of the Trx gene contains a series of stressresponsive elements, various transcription factor binding sites, such as SP1, AP-1, NF- $\kappa$ B, and the antioxidantresponse element (ARE) (5).

GSH is thought to be largely responsible for maintaining a low redox potential and free thiol levels inside cells and organelles due to its high intracellular concentration (1–10 mM). The Trx system, rather may play a critical role in the redox regulation of protein thiols involved in signal transduction and gene regulation(74).

Trx, which behaves as a soluble protein after disruption of cells, exists as one of the cytoplasmic proteins (Trx-1) and a mitochondrial (Trx-2) isoform (75).

Molecular studies show that both the cytoplasmic isoform of the mitochondrial Trx than that protect against oxidative stress and both are essential for the viability of mammalian cells (76). Given the huge number of

functions performed by Trx redox seems reasonable to say that it is a critical molecule essential for cell viability

Overexpression of Trx system/TrxR is generally associated with activation of cellular mechanisms of tolerance to stress and in general, a resistance to oxidative damage and / or nitrosative mediated a wide variety of stressors, including compounds such as doxorubicin and etoposide (77-79). The Trx plays a cytoprotective role against different forms of stress in a variety of biological systems. It was characterized primarily as a stress-inducible protein with a typical intracellular localization of cytosolic (75).

Many physicochemical stimuli, such as UV irradiation and hydrogen peroxide, have been shown to induce Trx expression and secretion, as a redox-sensitive molecule with cytokine-like and chemokine-like activities to prevent cell injury against oxidative stress. In addition to UV irradiation, treatment of cells in culture with phorbol esters, hydrogen peroxide, hypoxia, the cancer drug cisplatin and hemin has been reported to cause the translocation of Trx from the cytoplasm to the nucleus, where it regulates the redox-activation and DNA binding activity of critical transcription factors (Jun, Fos, p53, CREB, PEBP2/CBF, Myb), all involved in fundamental processes, such as gene expression, cell growth and apoptosis.

The Trx-1, the most extensively studied isoform, is primarily a cytosolic soluble protein without a specific localization signal. Several studies indicate that the Trx is expressed constitutively associated with protein sulfhydryl on the surface of the plasma membrane of different cell types (75).

Thioredoxin plasma levels in normal individuals vary between 20 and 30 ng/ml (80, 81) and increase in certain human diseases including HIV infection and cancer (5).

Elevated Trx levels may contribute to increased cancer cell proliferation and resistance to chemotherapy by several mechanisms as the

stimulation of DNA synthesis and the activation of redox-modulated transcription factors.

Recent work suggests that Trx-1 is involved in nerve growth factor (NGF) signaling pathways. NGF, a neurotrophic factor regulating development, maintenance and function of the CNS, has been shown to activate Trx-1 expression via cyclic AMP (cAMP)-response elements (CREs) present in the Trx-1 gene promoter, and also to induce nuclear translocation of Trx1 (5). Recent data suggest that, beyond its ability to regulate the function of proteins through thiol-disulfide exchange reactions, Trx and its substrates may also have beneficial effects during oxidative stress by upregulating HO-1(82), with important cytoprotective pleiotropic effects deriving from heme degradation and bilirubin formation (83). Besides the role as a source of reducing equivalents, Trx per se acts as antioxidant or ROS scavenger. In fact, Trx eliminates singlet oxygen, hydroxyl radical and hydrogen peroxide. Finally, the NO-dependent expression of Trx has been shown to be involved in the neuroprotection against oxidative stress mediated by estrogens(5).

*Carnosine* (β-alanyl-L-histidine) is one of the histidine dipeptides present in mammalian brain (84) at high concentration (2–20 mM) (85), particularly in neuroglia and certain types of neurons. At physiological concentrations, this dipeptide also has anticarcinogenic properties, acting as an antioxidant and anti antiglicante (86).

Since β-alanine is non-proteinogenic amino acid, it is obvious that carnosine is not product of protein catabolism: Instead it is synthesized enzymatically by carnosine synthetase, an enzyme present in brain and muscle that shows broad substrate specificità. The hydrolysis of carnosine is catalyzed by two enzymes recently cloned and characterized. Both enzymes belong to the M20 metalloprotease family. The enzyme named CN1 exhibits narrow specificity and the characteristics of the enzyme previously designated

XHis dipeptidase or carnosinase (5). The enzyme named CN2 displays broad substrate specificity and is ubiquitously expressed like the enzyme previously designated cytosol non-specific dipeptidase (5).

This dipeptide prevents neural toxicity in vitro (87,88), and protects neural cells against both ischemic injury (89) and aggregated forms of  $\beta$ -amyloid (90).

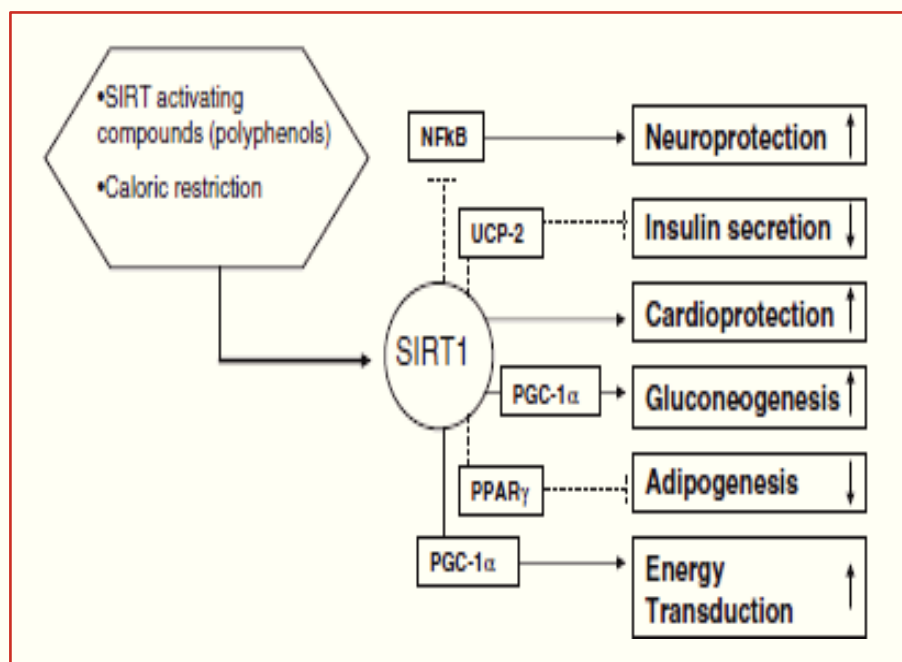
Furthermore, carnosine protects isolated neurons against reactive oxygen species overproduced by N-methyl- D-aspartate excitotoxic insult (91) and also prevents Cu, Zn-SOD from inactivation in vivo in senescence accelerated mouse-prone- (SAMP)- mice, an effect associated with prolonged average life span (92).

There is strong evidence to suggest that carnosine can delay the ageing process, as assessed in vitro, in human cultured senescent cells(93,94).

Notably, this dipeptide, by reacting non enzymatically with protein carbonyl groups, can prevent subsequent cross-linking and degradation of glycoxidized proteins (91). This process termed “carnosinylation” may be relevant during aging, where a significant accumulation of carbonyl groups in proteins, arising from oxidation- and glycation-related phenomena, has been observed (95). Remarkably, increased formation of carbonylated proteins occurring during aging suppresses proteasome activity (94,96,97). Aged polypeptides, in fact, may either be degraded by 20S proteasomes or cross-link to form aggregates intractable to proteolysis and inhibitory to proteasome activity. In these conditions, carnosinylation of glycated/oxidized proteins, by inhibiting crosslinkage with normal macromolecules could affect the fate and the biological significance of important proteins during conditions of free radical attack and oxidative stress, such as the aging process. Furthermore, it has recently been reported that carnosine can act as a selective inhibitor of NO-dependent guanylate cyclase activation, suggesting its use for treatment of different disorders (tumors, sepsis, asthma, etc) associated with an aberrant

activity of the intracellular signalling system: NO-soluble guanylate cyclase-cGMP (98). More recently, carnosine and some its synthetic analogues have been shown to counteract peroxynitrite–dependent damage, such as nitration of free tyrosine, a1AP, and LDL modification (99,100). Peroxynitrite, as a highly toxic oxidizing and nitrating agent, decomposes rapidly, generating reactive species which react with a variety of biological molecules, such as thiols, lipids, amino acids, antioxidants and nucleic acids and it is implicated in numerous human diseases (101,102).

The *sirtuins* are a group of proteins linked to aging, metabolism and stress tolerance in several organisms. In mammalian cells seven sirtuins have been identified. SIRT1, 2, 3, 6 and possibly 5 are NAD-dependent deacetylases , SIRT4 and 6 are ADP-ribosyltransferases, and the activity of SIRT7 has not been defined (103). The sirtuin family of histone deacetylases (HDACs) was named after their homology to the *Saccharomyces cerevisiae* gene silent information regulator 2 (Sir2). In the yeast, Sir2 has been shown to mediate the effects of caloric restriction on the extension of life span, with high levels of Sir2 activity promoting longevity (104).





Like their yeast homologs, the mammalian sirtuins (SIRT1-7) are class III HDACs and require NAD<sup>+</sup> as a cofactor to deacetylate substrates ranging from histones to transcriptional regulators. Through this activity, sirtuins are shown to regulate important biological processes, such as apoptosis, cell differentiation, energy transduction or glucose homeostasis.

Deacetylation and the ADP-ribosylation appear to be mediated by sirtuins. In deacetylation, the ADP-ribosyl transfer directly participates in the removal of the acetyl group from the protein substrate to generate 2,3-O-acetyl-ADP-ribose, whereas in ribosylation, the ADP ribosyl moiety is transferred to the protein substrate. Deacetylation of sirtuin substrates can inhibit or induce their activities, whereas ADP-ribosylation has only been shown to be inhibitory (103).

Several experimental evidences have shown the role of SIRT1 protein in human cell survival. SIRT1 specifically associates with the p53 tumor suppressor protein and deacetylates it, resulting in negative regulation of p53-mediated transcriptional activation. Importantly, p53 deacetylation by SIRT1 also prevents cellular senescence and apoptosis induced by DNA damage and stress. SIRT1 regulates important aspects of mitochondrial biology, e.g. it deacetylates the essential cofactor PGC-1 $\alpha$  (PPAR-c coactivator-1a) in mitochondrial biogenesis. An up regulation of the mitochondrial activity might be of therapeutic benefit for various diseases related to aging such as metabolic disorders (e.g. diabetes type 2) or mitochondrial disorders.

These studies provide important information on the activity of SIRT1 and offer a promising approach for the treatment of metabolic disorders. In addition, SIRT1 activation significantly decreases neuronal cell death induced by amyloid-beta( Ab) peptides through inhibition of NF- $\kappa$ B signaling . (105).

## *Aging*

Aging is a complex biological process characterized by a gradual decline in biochemical and physiological functions of most organs and is considered one of the most strong and significant risk factor for age-related neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's or Parkinson's disease. In particular, the aging process is accompanied by a general decline in physiological functions in the CNS.

Age-related changes in the brain include reduction of trophic supports, decreased proteosomal enzyme activities, mitochondrial dysfunction, and change in the redox status, which promotes a more proinflammatory environment associated with increased formation of reactive oxygen species. The free radical theory of aging postulates that ROS may produce oxidative damage directly to critical biological molecules, including proteins, DNA, and lipids. The oxidative damage to cellular macromolecules accumulates with age and has been postulated to be the main, but not the only, type of endogenous damage strongly involved in the aging process. Indeed, when postmitotic neurons are injured by oxidative stress, they cannot be replaced, carrying the detrimental effects of oxidative injury over the lifetime of the neuron population. The oxidative damage to proteins is reflected by increasing levels of protein carbonyls and decreasing levels of protein thiols. Protein carbonylation, among different types of posttranslational modifications, serves as useful biomarker

for the accumulation of oxidatively modified proteins. Several studies have indicated that the levels of oxidized proteins, exhibiting carbonyl groups, increase progressively with age in brain extracts of rats of different ages (106).

### ***Multiple sclerosis***

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune-mediated neurodegenerative disease with characteristic foci of inflammatory demyelination in the brain, spinal cord, and optic nerves. Recent studies have demonstrated not only that axonal damage and neuronal loss are significant pathologic components of MS and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), but that this neuronal damage is thought to cause the permanent neurologic disability often seen in MS patients. Current treatments for MS involve immunomodulation, which can reduce the incidence of inflammatory relapses. However, existing therapies are often not fully effective, and limited evidence suggests that these therapies prevent the long-term neuronal damage and physical disability of MS patients. New therapies that prevent neurodegeneration through nonimmunomodulatory mechanisms have a tremendous potential to work synergistically with current MS therapies ((107-109). MS pathology is characterized by perivenous infiltration of lymphocytes and macrophage leading to damage of myelin and axons in the brain and spinal cord, which underlie the clinical disease course usually occurring with recurrent and reversible episodes of neurological dysfunction affecting one or several sites, during late adolescence and early adulthood; this form is called relapsing-remitting form (RR) and it is the most prevalent (110). Usually, approximately 20 years later, this clinical pattern transforms into a secondary progressive phase with continuous and progressive neurological decline. Although evidence indicates that MS is a multifactorial disease caused by a complex interplay between genetic and environmental factors, it is still unclear which are the causes or the factors that contribute to its unpredictable course. It is generally accepted that, virus infections of the CNS, vascular factors and/or disturbed immune mechanisms are implicated in the pathogenesis of MS (111,112). Once triggered, the immune system attacks

and destroys myelin and the myelin-forming cell, leading to the pathological hallmarks of MS: the classical actively demyelinating lesions, the cortical demyelination and the diffuse white matter injury, the latter particularly evident in the later stage of the disease (112,113). Existing evidence indicates that CNS responds to the attack by immune cells and their secreted products through modulation of its metabolism and gene expression (114). In addition, cytokines, immunoglobulins, and complement complexes may elicit a survival response in the oligodendrocytes, involving the induction of endogenous heat shock proteins and other protective molecules, which indicates that redox systems and therefore the oxidant/antioxidant balance in these cells are of great importance in MS (115-118). The adaptation and survival of cells and organisms requires the ability to sense proteotoxic insults and to coordinate protective cellular stress response pathways and chaperone networks related to protein quality control (119). Despite the abundance and apparent capacity of chaperones and other components of homeostasis to restore folding equilibrium, brain cells appears poorly adapted for chronic proteotoxic stress which increases in neurodegenerative diseases such as MS (120).

In these conditions, a decline in biosynthetic and repair activities that compromises the integrity of the proteome is strongly influenced by protective genes called “vitagenes” that control aging, thus linking stress and protein homeostasis with the health antidegenerative mechanisms (121). Vitagenes encode for heat shock proteins (Hsp) Hsp32, Hsp70, the thioredoxin and the sirtuin protein systems. In the CNS, Hsps synthesis occurs after hyperthermia, alterations in the intracellular redox environment, exposure to heavy metals, amino acid analogs or cytotoxic drugs (121). While prolonged exposure to conditions of extreme stress is detrimental and can induce cell death, Hsps synthesis can result in stress tolerance and cytoprotection in various metabolic diseases and injuries, including hypoxia,

stroke, epilepsy, cell and tissue trauma, neurodegenerative disease and aging (120).

Although evidence indicates that MS is a complex trait caused by interaction of genetic and environmental factors, little is known about its cause or the factors that contribute to its unpredictable course. Several experimental results support the hypothesis that the central nervous system responds to attack by the immune system through modulation of its metabolism and the expression of genes that code for certain types of proteins

It has been shown that cytokines, immunoglobulins, and complement complexes may elicit a survival response in the oligodendrocytes, involving the induction of endogenous heat shock proteins (hsps) and other protective molecules, which suggests that redox systems, and therefore the oxidant/antioxidant balance in these cells, are of great importance in MS. The pharmacological modulation of pathways that control cellular stress is a growing importance of interest implications for the treatment of cardiovascular diseases, cancer and neurodegenerative.

Thus, pharmacological modulation of cellular stress pathways has emerging implications for the treatment of human diseases, including cardiovascular disease, cancer and neurodegenerative disorders.

### ***Antioxidant and Neuroblastoma cells SH-SY5Y***

Recent studies show that a minimum amount of free radicals, which until now have been considered only due to aging is a necessary condition for optimal cell function because it leads to a more efficient defense systems and increased cell survival (68).

Bis(2-hydroxybenzylidene)acetone is a potent inducer of the phase 2 response through the Keap1-Nrf2-ARE pathway to study the protective effects of antioxidant molecules, including the HBB-2.

This double Michael reaction acceptor reacts directly with Keap1, the sensor protein for inducers, leading to enhanced transcription of phase 2 genes and protection against oxidant and electrophile toxicities.

Experimental evidence show that Bis(2-hydroxybenzylidene) is a potent chemoprotective agents, infact low concentrations (in the submicromolar range) of bis(2-hydroxybenzylidene)acetone markedly increased the activities of NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1) and glutathione reductase, and the levels of total glutathione, three markers of the phase 2 response. In contrast, at high concentrations (in the micromolar range) the same compound caused G2/M cell cycle arrest and apoptosis (122).

It was assumed the role of an antioxidant compound synthesis as the bis(2-hydroxy-benzilidene) acetone or HBB-2 as a possible modulator of vitageni its use in vivo

It was also assumed its neuroprotective effect in human neuroblastoma cells exposed to nitrosative stress induced by SIN-1 to support the hypothesis that HBB may have anti-aging in the central nervous system.

The human neuroblastoma cells SH-SY5Y subclones neuroblasts are an extensively characterized cell line SK-N-SH(123,124) obtained in 1970 by a fabric of a metastatic neuroblastoma of a little girl of four years (125). Neuroblastomas are tumors in childhood-onset originating from immature neuroblasts during the development of the peripheral nervous system(126). The cell line SH-SY5Y cells are a cell population from neuroblast-like morphology, with a teardrop-shaped cell body (127) and small neurites, which grow to form small aggregates or clusters (125, 128) while a smaller part is in suspension, and represents the cells in mitosis. These cells are a well-characterized model for the study of in vitro differentiation into a neuronal-like phenotype inducible by various exogenous differentiating agents such as retinoic acid, phorbol esters, nerve growth factor (NGF), and the membrane-

permeable analogue of cAMP, the cAMP-dibutiril(124, 129, 130). The differentiation of these cells is associated with the extension of long neurites and can be quantified by morphological analysis of neuritogenesis (124,127)

The line SH-SY5Y is also used as a model for the study of neuronal cell death induced by oxidative stress associated with several chronic neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Alzheimer's and Huntington's (131). They are also used as a model for the dopaminergic neurotransmission and sympathetic study of Parkinson's disease (132).

Express adenosine A1 and A2A receptors and, in the presence of inhibitors of phosphodiesterase, increase levels of cAMP even in the absence of a receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase evidence to suggest that the basal levels of cyclic nucleotides are subject to a high turnover

(133). Other features of the cell line include the ability to convert glutamate into GABA, choline into acetylcholine, and the presence of dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity. Express  $\mu$  opioid receptors and  $\delta$ , in particular the  $\alpha 2$  adrenergic receptor  $\delta 2$  and(134, 130)

They are also considered an appropriate model for the study of  $\sigma$  receptors(132).

The cells also express the calcium channels, and N-type and L-type muscarinic receptors (M3) and nicotinic receptors for neuropeptide Y (Y2 receptors) (132, 135).

### ***SCI and Carnosine***

SCI is a highly debilitating pathology, could have traumatic or non-traumatic origin and often could lead to devastating and catastrophic dysfunction. SCI imposes high physical and psychological effects not only to the individual but also to the family and society. Over the past years much research has been performed on elucidating the mechanisms of SCI.

Experimental and clinical studies have suggested that acute SCI is a two-step process involving primary and secondary mechanisms. Primary injury of the spinal cord refers to the initial mechanical damage due to local deformation of the spine. Direct compression and damage of neural elements and blood vessels by fractured and displaced bone fragments or disc material occur after mechanical trauma. The secondary mechanism includes a cascade of biochemical and cellular processes, such as electrolyte abnormalities, formation free radicals, vascular ischemia, oedema, post-traumatic inflammatory reaction, apoptosis or genetically programmed cell death and other processes (136). It is known that a progressive neuronal injury results from a combination of secondary injury factors including: ischemia, biochemical alterations, excitotoxicity, neurotransmitter accumulation, protein and lipid oxidation associated with the generation of free radicals (137,138). Consistent with this idea, neurodegenerative diseases, are characterized by increased production of reactive oxygen molecules (ROS) such as superoxide anions, hydrogen peroxide and peroxynitrite (139). Free radical-mediated oxidation of lipids, proteins and DNA contribute to enhance adverse mechanisms of neuronal injury, such as spinal cord hypoperfusion, development of oedema, axonal conduction failure and breakdown of energy metabolism (140). The importance of free radical mediated cell damage in the SIC is supported by the large number of experimental and clinical studies demonstrating the efficacy of antioxidants agents in improving neuronal damage (106,119,141,142). L-Carnosine is a small molecule composed of the amino acids L-histidine and b-alanine. This dipeptide is found in relatively high concentrations in several body tissues—most notably in skeletal muscle, heart muscle, skin, stomach, nerve tissue and brain. Although the exact biological role is not well understood, numerous studies have demonstrated, both at the tissue and organelle level, that it is endowed with strong and specific antioxidant properties by preventing and reducing the accumula-tion



of oxidised products derived from the lipid peroxidation (LPO) of biological membranes, including amazing anti-aging actions (143). L-Carnosine has been recently proposed to act as antioxidant in vivo (144,145). It was demonstrated the neuroprotective effect in astrocytes exposed to LPS- and INF-gamma-induced nitrosative stress (146). It is important to note that L-carnosine counteracts peroxynitrite-dependent protein alterations such as tyrosine nitration (147). Recent evidence demonstrated that L-carnosine prevents the up-regulation of iNOS and the induction of both HO-1 and Hsp-70 following nitrosative injury (146). In addition, a correlation has been found between cell protection and nitric oxide (NO) free-radical scavenging activity of L-carnosine that showed direct NO-trapping ability in cell-free experiments (148). Such important results can be used to define L-carnosine as an important Heat Shock Response activator, overcoming its considered classical role as multi-target protective compound.

L-Carnosine has been called a longevity nutrient since laboratory studies on tissues indicate that it can delay senescence and provoke cellular rejuvenation in cultured human fibroblasts. Carnosine has been called the anti-aging and anti-oxidant dipeptides (149). L-Carnosine is, however, known to be rapidly hydrolyzed in human serum by specific hydrolytic enzymes (carnosinases) (150,151), which may limit its therapeutic potential (152). Such a problem can be overcome by the use of L-carnosine derivatives stable in human serum (153,155). Specifically, D-carnosine, a non-natural isomer resistant to hydrolysis by carnosinases besides being stable in the plasma, is able to cross the blood–brain barrier, providing therefore, a suitable rationale for systemic interventions in free radical-related diseases (156).

## AIM OF THE RESEARCH

Under normal conditions, the cell antioxidant defense systems operate very efficiently. There is a balance between pro-oxidant and antioxidant necessary for the maintenance of antioxidant defense system that, during normal cellular metabolism, is able to eliminate all free radicals that are generated (7).

Numerous experimental data show evidence of the involvement of oxidative stress in aging and neurodegenerative disorders (19). In recent years, since oxidative stress has been considered the basis for some aspects of neurodegeneration, numerous experimental investigations have been conducted in order to reduce the effects of oxidative stress through the use of scavengers of free radicals (32).

From a molecular point of view, the central nervous system (CNS), cells are able to fight oxidative stress with many resources including bioactive molecules (glutathione, thioredoxin, flavonoids), lipoic acid, enzymes (heat shock proteins, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin reductase, etc.) and redox sensitive transcription factor protein (64).

The heat shock proteins (HSP) is one of the most studied active defense systems against oxidative damage. The heat shock response to contribute took off a cytoprotective state in a wide variety of human diseases such as inflammation, cancer, aging and neurodegenerative disorders

Vitagenes encode for heat shock proteins (Hsp) Hsp70, and heme oxygenase-1, the thioredoxin and the sirtuin protein systems.(64), open new prospective in medicine and pharmacology that molecules capable of

activating these defense mechanisms are a potential target for novel cytoprotective strategies (157-161).

The aim of the present study are as follows:

### **1) Aging:**

- dose levels of expression of stress proteins by Western blot analysis, in brain areas of aged rats, using antibodies specific: Hsp-90, Hsp-70, HO-1, Trx, TrxR, CN1, 4-HNE, DPNH.

- investigate the role of free radicals in the aging process, through a redox proteomics approach.

- investigate the oxidation of specific proteins by measuring the protein carbonyl levels in four different brain regions of rats "(Hippocampus, cerebellum, cortex and striatum) of 28 months (senescent) and 12 months (adults).

- identify proteins that are specifically oxidized during the process of aging in different brain regions because many of these proteins are related to the functionality of mitochondria, the energy metabolism and activity of chaperones.

### **2. Multiple sclerosis**

Experimental evidence indicates that MS is a multifactorial disease caused by a complex interplay between genetic and environmental factors, it is still unclear which are the causes or the factors that contribute to its unpredictable course (8). It has been hypothesized that the redox system and then the budget oxidant redox / antioxidant is implicated in the pathogenesis of MS (13).

The present study was undertaken in order to investigate systemic stress response and the associated oxidative stress measured through the determination of markers of protein and lipid oxidation in plasma, lymphocytes and CSF of patients with active MS, as compared to age-matched controls, in order to gain a better insight into the molecular

mechanisms regulating the cellular stress response during the progression of the disease and, as such, provide a potential target for novel cytoprotective strategies impacting the clinical settings of this degenerative disease.

The research includes the following objectives:

- determining the level of Hsp-72 and H-1 and SIRT in plasma and in lymphocytes from control subjects and patients with MS by Western blot analysis.

- study, using a redox proteomics approach to the role played by free radicals in multiple sclerosis.

- investigate the oxidation of specific proteins analizzare l'ossidazione di specifiche proteine by measuring the protein carbonyl levels in the serum of patients with MS and control subjects.

### **3 Antioxidants and neuroblastoma**

To understand the possible mechanisms underlying the protective molecules with antioxidant activity including the HBB-2 in the Central Nervous System will be studied in vitro, the role dell'HBB-2 cytoprotective against inflammatory and oxidative insults mediated by SIN-1, generating peroxynitrite (NO) and in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y).

To assess the cytoprotective effects dell'HBB-2 will be studied in vitro in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) to:

- examine the effect of L-acetylcarnitine neuroprotettivo in human neuroblastoma cells SH-SY5Y cells exposed to oxidative stress induced dall'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- evaluate the expression levels of HSPA-70 and H-1, as markers of oxidative stress and cell viability to investigate the cytoprotective effects of L-acetyl-carnitine in human neuroblastoma cells SH-SY5Y cells exposed to oxidative stress in the absence and presence of L-acetyl-carnitine

- assess levels of stress protein Hsp-72 in human neuroblastoma subjected to nitrosative stress after treatment with HBB-.

#### **4 SCI and Carnosine**

The importance of free radical mediated cell damage in the SIC (spinal cord injury) is supported by the large number of experimental and clinical studies demonstrating the efficacy of antioxidants agents in improving neuronal damage (106,119,141,142).

Although the exact biological role is not well understood, numerous studies have demonstrated, both at the tissue and organelle level, that it is endowed with strong and specific antioxidant properties by preventing and reducing the accumulation of oxidised products derived from the lipid peroxidation (LPO) of biological membranes, including amazing anti-aging actions (143).

Thus the aim of the present study was to investigate the efficacy of L and D-carnosine on the animal model of SCI.

. The objective was to determine the levels of expression of markers of oxidative stress Hsp-70 in mice with SCI in the absence and presence of L-carnosine and carnosine-D compared to control mice.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Aging

#### Animals

All animal protocols were approved by the University of Catania Laboratory Animal Care Advisory Committee. Male Wistar rats purchased from Harlan (Udine, Italy) were maintained in a temperature- and humidity-controlled room with a 12-h light=dark cycle. Rats 12 months old (aged) and 28 months old (senescent) (n<sup>1</sup>/<sub>4</sub>eight per each age group), were fed ad libitum a certified diet prepared according to the recommendations of the AIN, and the percentage energy composition is given in Table 1. After the animals were killed, brains were quickly removed and dissected into the cerebral cortex, hippocampus, septal area, and striatum, according to a standardized procedure, in a cold anatomic chamber and by following a protocol that allows a maximum of 50-s time variability for each sample across animals. Substantia nigra (SN) was dissected from the deepest part of the interpeduncular fossa. To exclude the possibility that the small size of nigral or septal samples could affect results, we analyzed pooled samples from SN or septum, to have a protein content comparable to that measured in cortex or striatum, and lipid peroxidation products as well as thiols, enzymes, and trace metals measured. In all these cases, we did not find significant differences between pooled samples and those coming from a single experimental animal.

For Proteomic assay Brain samples were minced and suspended in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4) containing 137 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, and 0.6 mM MgSO<sub>4</sub> as well as proteinase inhibitors: leupeptin (0.5 mg/ml), pepstatin (0.7 lg/ml), type II S soybean trypsin inhibitor (0.5 lg/ml), and PMSF (40 lg/ ml). Homogenates were centrifuged at 14,000g for 10 min to

remove debris. Protein concentration in the supernatant was determined by the “Coomassie Plus Protein Assay” (Pierce, Rockford, IL).

## **2. Multiple sclerosis**

### **Ethical permission**

The study was conducted according to guidelines of local Ethics Committee, and informed consent was obtained from all patients.

### **Multiple sclerosis patients**

Twenty-six patients with an age range of 20–60 years were used as the “test” group for this study. The mean disease duration was  $3.9 \pm 2.0$  years. All these patients had a confirmed clinical diagnosis of MS according to the diagnostic criteria of McDonald et al. (162). Furthermore, all the subjects were clinically classified having the relapsing remitting form of MS according to the criteria described in Lublin and Reingold (163). The patients had not been undergoing corticosteroid or immunosuppressive treatment for at least 2 months before the CSF samples were collected.

### **Control patients**

Twenty control patients, with an age range of 30–60 years, underwent lumbar puncture because of suspected subarachnoid hemorrhage, pseudotumor cerebri, oculomotor palsies, or other indications in the usual neurological survey. Laboratory and neuroimaging tests were normal. Therefore the final diagnosis was mainly tension headache or conversion disorder.

## **Sampling**

Blood was collected from controls and patients by venipuncture from an antecubital vein into tubes containing 500 mM EDTA as an anticoagulant. Immediately after sampling, 1 ml the blood was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C to separate serum from red blood cells and 4 mL were utilized for lymphocytes purification. Lymphocytes from peripheral blood were purified using the Ficoll Paque System following the procedure provided by the manufacturer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) (164). CSF was obtained (on ice) from all subjects by lumbar spinal tap. The CSF samples were immediately centrifuged at 10,000 g for 3 min at 4 °C to remove any contaminating cells and kept on ice until the biochemical assays were performed. Chemical analysis of CSF showed no heme present in the CSF in any of the control or MS CSF samples. CSF lymphocytes count was  $1.05 \pm 1.17$  in the first MS CSF sample and  $1.04 \pm 1.15$  in second ones. The control group lymphocytes count was  $1 \pm 0.12$ .

### ***Antioxidant and neuroblastoma***

Human neuroblastoma SHSY5Y cells (CRL-2266, American Type Culture Collection Rockville, MD, USA) is a well established cell line, corresponding to a third successive subclone of the SK-N-SH line originally established from a bone marrow biopsy of a neuroblastoma patient. The parental cell line comprises at least two morphologically different phenotypes, neuroblastic (N-type) and substrate adherent (S-type), which can undergo trans-differentiation (165). SHSY5Y cells can differentiate into cells with neuronal morphology, the phenotype of which varies depending on the inducing agent (166,167). SHSY5Y cells cultured in 50%MEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 2 mM glutamine streptomycin (0.1 mg/ml) and 50% Nutrient F12 HAM. Cells were maintained at 37 °C in CO<sub>2</sub> incubator in a saturated humidity atmosphere containing 95% air and 5% CO<sub>2</sub>.



Subconfluent monolayers were initiated to differentiate

The confluent cells were then exposed to treatment as shown in Table 1 and 2.

After the various treatments, the cells were washed 3 times with PBS (pH 7.4), scraped and pelleted. The cell pellet was resuspended in 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.4), 0.5 mM phenyl-methyl-sulfonylfluoride (PMSF) and homogenized prior to analysis by *Western blot*.

The cytosolic protein fraction (50 g) samples of the homogenates, obtained after centrifugation at 10,000 rpm for 5 min. at 4 ° C was used to determine the levels of expression of heat shock proteins by Western blots . For the assay of cell viability of the cells were plated in 96-well multiwell and exposed to treatment as in Table 1 and 2.

TREATMENTS	TIME
CTRL	6h e 24h
HBB-2 (2µM)	6h e 24h
HBB-2 (5µM)	6h e 24h
HBB-2 (10µM)	6h e 24h
HBB-2 (20µM)	6h e 24h
SIN-1 (1 mM)	7h
HBB-2 (2µM)+SIN-1 (1 mM)	6h(+7) e24h (+7)
HBB-2 (5µM)+SIN-1 (1 mM)	6h(+7h) e24h (+7h)
HBB-2 (10µM)+SIN-1 (1 mM)	6h (+7h) e 24h(+7h)
HBB-2 (10µM)+SIN-1 (1 mM)	6h(+7h) e24h (+7h)

TREATMENTS	TIME
CTRL	6h e 12h
LAC (20µM)	6h e 12h
LAC (50µM)	6h e 12h
LAC (100µM)	6h e 12h
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2mM)	-1h
LAC (20µM)+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2mM)	6h (-1h) e 12h(-1h)
LAC (50µM)+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2mM)	6h (-1h) e 12h(-1h)
LAC (100µM)+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2mM)	6h (-1h) e 12h(-1h)

## SCI

### Animals

Male Adult CD1 mice (25–30 g, Harlan Nossan, Milan, Italy) were housed in a controlled environment and provided with standard rodent chow and water. Animal care was in compliance with Italian regulations on protection of animals used for experimental and other scientific purpose (D.M. 116192) as well as with the EEC regulations (O.J. of E.C. L 358/1 12/18/1986).

### SCI

Mice were anaesthetized using chloral hydrate (400 mg/kg body weight). A longitudinal incision was made on the midline of the back, exposing the paravertebral muscles. These muscles were dissected away exposing T5–T8 vertebrae. The spinal cord was exposed via a four-level T5–T8 laminectomy and SCI was produced by extradural compression of the spinal cord at level T6–T7 using an aneurysm clip with a closing force of 24

g. Following surgery, 1.0 cc of saline was administered subcutaneously in order to replace the blood volume lost during the surgery. During recovery from anesthesia, mice were placed on a warm heating pad and covered with a warm towel. Mice were singly housed in a temperature-controlled room at 27 8C for a survival period of 10 days. Food and water were provided to the mice ad libitum. During this time period, the animals' bladders were manually voided twice a day until the mice were able to regain normal bladder function. In all injured groups, the spinal cord was compressed for 1 min. Sham animals were only subjected to laminectomy.

### **. *Experimental design***

Mice were randomly allocated into the following groups:

(i) SCI + vehicle group. Mice were subjected to SCI plus administration of saline (administered i.p., 1 h and 6 h after SCI) (N = 10);

(ii) D-carnosine group. Same as the SCI + vehicle group but in which D-carnosine (150 mg/kg) was administered i.p., 1 h and 6 h after SCI (N = 10);

(iii) L-carnosine group. Same as the SCI + vehicle group but in which L-carnosine (150 mg/kg) was administered i.p., 1 h and 6 h after SCI (N = 10); (iv) Sham + vehicle group. Mice were subjected to the surgical procedures as the above groups except that the aneurysm clip was not applied and to these mice were administered saline (administered i.p., 1 h and 6 h, after SCI) (N = 10);

As described below mice (N = 10 from each group for each parameters) were sacrificed at 24 h after SCI in order to proceed with the different analyses and parameter evaluations. In a separate set of experiments other 10 animals for each group were observed until 10 days after SCI in order to evaluate the motor score. In another set of experiments other 10 animals for each group were observed in order to evaluate the dose-effect curve.

### **Protein measurements**

Samples protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid method (Cod 23227 Pierce Protein Research Products, Rockford, IL 61101 U.S.A.) according to the method described in Smith et al. (168) and using bovine serum albumin as standard. This assay determines the concentration of an unknown sample of protein (mg / ml), or it can be used to determine the total amount of protein in a sample of unknown protein (mg). The BCA assay has a linear concentration range from 200-1000  $\mu$ g of protein per milliliter. The method is based on the formation of a  $\text{Cu}^{2+}$ -protein complex under alkaline conditions followed by reduction of  $\text{Cu}^{2+}$  to  $\text{Cu}^{+}$ .

Cysteine, cystine, tryptophan, tyrosine and the peptide bond are capable of reducing cupric to cuprous ion. Bicinchoninic acid forms a complex with the blue-purple  $\text{Cu}^{+}$  under alkaline conditions providing a basis for monitoring the reduction of  $\text{Cu}^{2+}$  by proteins.

The test is usually performed at 37 ° C, since the increase of temperature favors the development of color.

Is the measured absorbance at 562 nm and the protein concentration was determined by comparison with a standard curve

### **Western blot analysis**

The levels of stress proteins were assessed by Western blot analysis .

Equal concentrations of protein extracted for each sample (50  $\mu$ g) were separated on a polyacrylamide mini gels precasting 4-20% (cod NB10420 NuSept Ltd Australia).

Before being loaded on the gel, samples were boiled for 3 minutes in sample buffer(containing 40 mM Tris-HCl pH 7.4, 2.5% SDS, 5% 2-

mercaptoethanol, 5% glycerol, 0.025 mg / ml of bromine phenol blue).The proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (0.45 $\mu$ M) (BIO-RAD Hercules, CA, USA)in transfer buffer containing(0.05% di SDS, 25mM di Tris, 192mM glycine and 20% v/v methanol ).

The transfer of the proteins on the nitrocellulose membrane was confirmed by staining with Ponceau Red which was then removed by 3 washes in PBS (phosphate buffered saline) for 5 min. each The membranes were then incubated for 1 hour at room temperature in 20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl and Tween 20 (TBS-T) containing 3% milk powder and incubated overnight with primary antibody at 4 ° C in TBS-T containing 1% milk powder.The membranes were incubated with appropriate primary antibodies overnight at 4 ° C in TBS-T. Excess unbound antibodies were removed by 3 washes are with TBS-T for 5 minutes. After incubation with primary antibody, the membranes were washed 3 times for 5 min. in TBS-T and then incubated for 1 h at room temperature with the secondary polyclonal antibody conjugated with horseradish peroxidase (dilution 1:2000). The membranes were then washed 3 times with TBS-T for 5 minutes.The same membrane was incubated with a polyclonal antibody anti-beta-actin (SC 1615 Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA, dilution 1:1000) to verify that the concentration of protein loaded in the gel was the same in each sample. Finally, the membranes were incubated for 3 minutes with SuperSignal chemiluminescence detection system kit(Cod 34080 Pierce Chemical Co, Rockford, USA) to display the specific protein bands for each antibody. The immunoreactive bands were quantified by capturing the luminescence signal emitted from the membranes with the Gel Logic 2200 PRO(Bioscience) and analyzed with Molecular Imaging software for the complete analysis of regions of interest for measuring expression ratios. The molecular weight of proteins analyzed was determined using a standard curve prepared with protein molecular weight

### **Reduced and oxidized glutathione assay**

Reduced glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) were measured with the NADPH-dependent GSSG reductase method, as described in Adams et al (169). Plasma GSH and GSSG were measured as described, except that DTNB or NEM solutions were directly added to equal volumes of whole blood and, after tilting, centrifuged at 2000 g for 6 min at 48C. GSH and GSSG standards in the ranges between 0 and 10 nM and 0.010 and 10 nM, respectively, added to control samples, were used to obtain the relative standard curves, and the results were expressed in nanomoles of GSH or GSSG, respectively, per milligrams protein.

### **Free and protein-bound sulfhydryl groups assay**

Protein and nonprotein sulfhydryl (SH) compounds in different brain regions and in liver were estimated by the DTNB-based method of Sedlak and Lindsay (170). The content of SH groups was expressed in nanomoles per milligram of protein.

### **Carnosinase assay**

The solution containing carnosinase (0.1–5 ml) was incubated with carnosine (10mM) in 50ml of 50mMTris=HCl, pH 8.0, for 2 h at 378C. The reaction was stopped by adding 10 ml of 0.5N TCA. After centrifugation (15,000 g for 5 min), the final mixture was used to assay the histidine content with spectrofluorimetry (171), in 96-well plates. Then 90 ml of 2MNaOH and 90 ml of 0.05% mM o-phthaldialdehyde (OPA) were added to the deproteinized sample, incubated at 378C for 15 min until the addition of 90 ml of 4 M H3PO4. After 15 more minutes at 378C, the solution was left at room temperature for 30 min before fluorescence measurement (lexc, 340 nm,

and lem, 450 nm), carried out on Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer equipped with a Microplate reader (Varian, Palo Alto, CA).

### **Vitality assay**

Cell viability was assessed by MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide (Cod. M2128 Sigma).

The test MTT cytotoxicity assay is a colorimetric test that allows the proliferation and cell viability and in particular the efficiency of mitochondrial. The MTT is a tetrazolium salt that in the case of viable cells is reduced by highly reducing environment of proliferating cells by the action of mitochondrial dehydrogenases.

The reduction results in the formation of MTT formazan crystals which give a characteristic purple color to the mitochondria of viable cells. By contrast, in non-proliferating cells, or death, then having no active mitochondria, MTT will not be reduced resulting in a less intense purplish color (172). The testing procedure requires that cell viability in each well are deposited 10µl of a solution of MTT 0.5 mg / ml and the whole is incubated for 3 hours (the incubation time should not exceed 4 hours since the MTT is cytotoxic) at 37 ° C with an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and saturated humidity. Expired the time of incubation, MTT solution is removed and added 120 µl of acid isopropanol to dissolve the formazan crystals formed. The staining intensity of the resulting solution is directly proportional to the concentration of formazan and is therefore an expression of cell viability. The optical density (OD) is measured spectrophotometrically at a wavelength of 570 nm.

The degree of cell viability and hence the degree of toxicity of the test compound can be expressed by the following formula.

$$\% \text{ Cell viability} = [\text{OD (570 nm) test compound} / \text{OD (570 nm) negative control}] \times 100.$$

Cell viability is calculated by measuring the difference in optical density between the treated samples compared to controls.

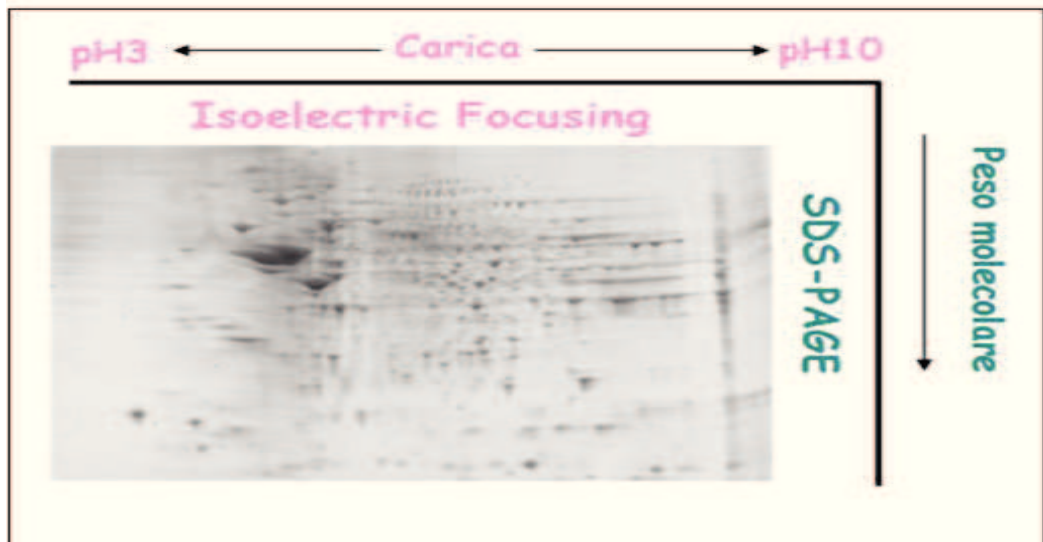
### **Proteomic and redox proteomics**

To understand how oxidative stress may contribute to neurodegenerative processes you must have an overall view of oxidative modifications affecting cellular proteins.

A useful aid in this investigation is the use of recent techniques of proteomic analysis and redox-proteomics. The proteomic analysis is based on the possibility of splitting protein mixtures by electrophoresis mono-and/or two-dimensional (2-DE) polyacrylamide gel and the subsequent identification of protein bands of interest by means of mass spectrometry. The 2-DE appears to be a best practice for the global analysis of protein as has been shown to separate, quantify and identify thousands of proteins in a single gel. Two-dimensional electrophoresis (see image below) the first dimension consists of an isoelectric focusing under denaturing (separation according to isoelectric point). The second dimension is electrophoresis in SDS (separation according to molecular weight).

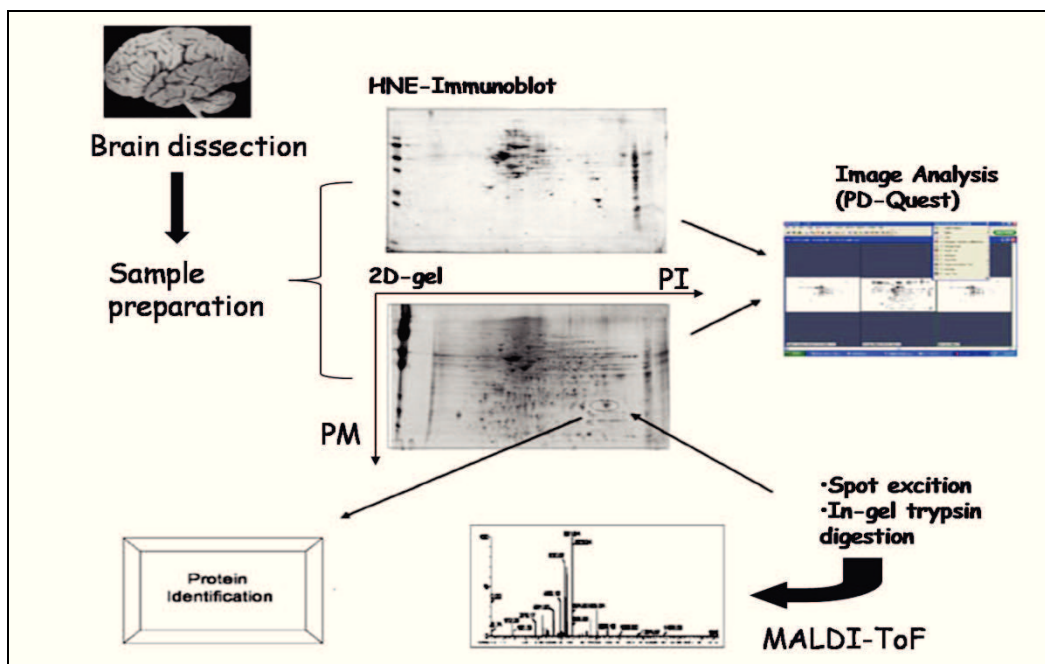
After appropriate staining, the images of two-dimensional gels (at least 6 samples for each study group) are acquired using a densitometer and then analyzed with the PDQuest 2-D Analysis (Bio-Rad), a complex and sophisticated software that allows a valid comparative analysis and allows the simultaneous analysis of gels obtained under the same conditions.





**-Example of two-dimensional electrophoresis**

The intensity of each spot on this gel is compared within each group using an appropriate statistical analysis. Only proteins that differ significantly from those of the corresponding controls by analysis of Student's T-test are selected for identification. To this end, the spots are cut on the gel and digested with trypsin. The resulting peptides are then extracted and subjected to analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. The insertion of the MALDI spectra obtained from tryptic fragments in a database available online ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) allows the identification of proteins of interest. The identification of oxidative modifications of proteins against oxidative stress-induced conditions can be done by redox proteomics which allows to identify the protein carbonyl, nitrosyl and related all'HNE. This technique couples the two-dimensional electrophoresis with immunochemical methods for the detection of oxidized proteins (See image below).



### **-Protocol for the identification of proteins oxidized by redox proteomics analysis**

The immunoblot (Western blot) is obtained by using specific antibodies directed against dinitrophenylhydrazone (protein carbonyls) or 3-NT (protein nitrosylation) or HNE (4-hydroxynonenal-related proteins). The comparative analysis of protein maps obtained is that 2-DE gel membrane (immunoblot) analysis using appropriate statistical software, allows the identification of spots corresponding to proteins that are significantly oxidized in experimental samples compared to control samples. These proteins are then identified by mass spectrometry and comparison with databases

#### ***Two-dimensional electrophoresis***

The samples (containing 200 g of protein) were prepared according to the method of Levine et al(173). Proteins were precipitated by the addition of TCA (trichloroacetic acid) at a final concentration of 15%. After 10 min on ice, pellets were collected by centrifugation at 14,000 g for 2 min and washed

3 times with 0.5 ml of ethyl acetate / ethanol (1:1). After washing, the samples were resuspended in 185  $\mu$ l of rehydration buffer composed of 8M urea, 20 mM dithiothreitol, 2.0% CHAPS (w / v), 0.2% Biolytes, 2 M thiourea, and bromophenol blue. For the first dimension, 200  $\mu$ l of sample were loaded along the lanes of a tank for isoelectrofocusing taking care to distribute as evenly as possible along a single lane. Then the strips (ReadyStrip IGP Strip 3-10 pH, Biorad) were placed 17 cm in the sample solution for 1 h to allow rehydration and uptake of proteins everything was then placed into the Protean IEF Cell Apparatus (Bio-Rad) at 50V for 16h. After 1 hour of racing were added 2 ml of mineral oil on each lane in order to avoid evaporation.

After rehydration, the strips were subjected to isoelectric focusing using the following program of focus: 300 V for 2h (slope Slow); 500 V for 2 h (slope Slow); 100 V for 2 h (slope Slow); 8000 V for 8 h (slope Slow); 8000 V for 10 h (slope Slow).

The samples thus treated were separated according to isoelectric point. All procedures were performed at room temperature

For the second dimension, the strips were treated for 10 min in buffer containing balance: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, urea 6M, SDS 1% (w/v), glycerol 30% (v/v) and dithiothreitol 0.5%, and then re-equilibrated for 15 min in the same buffer containing 4.5% iodoacetamide instead of dithiothreitol. Then each strip was placed on top of a precast gels Linear Gradient (8-16%) and 12% Criterion XT Precast (Biorad) and sealed with agarose.

The race was conducted at 200 V for 65 min as standard using a solution of Biorad Precision Protein<sup>TM</sup>. The samples thus treated were separated according to molecular weight

Once the second dimension gels were then incubated in fixing solution (7% Acetic acid, 10% methanol) for 20 min. and stained with approximately

40 ml of Bio-Safe Coomassie Stain Gel (Bio-Rad) for 1 hour in moderate agitation. Finally the gels were kept overnight in deionized water to remove the dye.

### **Redox Proteomics**

To make derivatizing the protein carbonyl samples were incubated with four volumes 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 10 mM HCl and subjected to two-dimensional electrophoresis as described previously.

Proteins (200  $\mu$ g) were incubated with 4 volumes of 20 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine at room temperature (25 ° C) for 20 min. The gels were prepared in the same way as for two-dimensional electrophoresis.

. Proteins of the second dimension gels were transferred onto nitrocellulose membrane using the apparatus' criterion blotter BIO-RAD, the race was conducted at 150 V for 2 h.

The membrane was then incubated with a rabbit primary antibody(Chemicon) (1:100) specific for DNP-protein adducts followed by a secondary antibody goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma, ST Louis, MO, USA) (1:5000). The membrane was then developed with SIGMA FAST (5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitro blue tetrazolium in TBS).

### ***Image analysis***

8 gel (n = 4 and n = 4 treated controls) and 8 nitrocellulose membranes were scanned using HP Deskjet H2180 (Hewlett Packard).

Through the use of a scanner, that reproduces the intensity, intensity, position and size of spots, and the subsequent conversion of data in TIF format is obtained by numerical information used by various software. The identification of proteins expressed in different sets of gels from different

experiments requires specific software for image evaluation can discern between the spots and spot the differences. The analysis software, which has been used for matching and analysis of protein spots of different gels and membranes, is the PDQuest 2D (Version 7.2.0, Bio-Rad).

This program allows you to perform accurate analysis of comparative analysis of several gels or patches at once. The PDQuest 2D includes a series of steps that can be summarized as follows: "scanning, automatic detection of commercials and image processing, matching between gels, normalization and differential analysis

The first images of the gels undergo a process in which the software provides the background subtraction and vertical and horizontal lines and create a value for each spot of Gaussian according to its three coordinates. This is necessary so you are able to identify the spots confused, striped or partially overlapping and which could not be distinguished otherwise

This creates 3 files: the original, filtered, and the reconstructed image, which arises from the Gaussian calculated for each spot.(this virtual image is on the software works later).

At this point the operator must indicate the spots smaller, fainter, and the largest group of spots in the gel. Unfortunately, the automatic identification is never entirely accurate and touches the operator to add or remove the spots identified incorrectly.

To perform the matching between gels is necessary to choose a gel reference (usually the best place there are different spots). To make the comparison between the gels indicated the program is a series of landmarks, ie the common spots between the gels that the software will use as a reference to align and position the gels. During matching, the program creates a reference image which is a virtual gel resulting from the sum of all the spots from all gels of the match This gel will be used to master the comparison between the different matches. When comparing the gels are often variations

that are not attributable to a difference in protein expression but eg. a slight difference in the amount of material loaded between different gels or differences in the intensity of staining of a gel and more. It is therefore necessary to normalize the gels that you want to compare To normalize the intensity values representing the amount of protein per spot was used as the mode of background subtraction. After completing the spot matching normalized intensity of each spot from the gels or membranes was compared between groups using statistical analysis The statistical significance was assessed using the Student t test and were considered significant if P values.  $P < 0,05$ . In this study, the molecular mass and isoelectric point of most of the spots were determined

interpolation between points of reference characteristic of each image.

### **Digestion with trypsin**

The selected protein spots are excised from the gel and transferred to eppendorf. The protein spots are washed with 0.1 M ammonium bicarbonate ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) for 15 min at room temperature. Pieces of gel is added to acetonitrile and then are incubated for 15 min at room temperature. The solvent removed, the gel pieces were dried in a flow hood. The protein spots were incubated with 20  $\mu\text{l}$  of 20 mM DTT, and 0.1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  at 56 ° C for 45 minutes The DTT solution was then removed and replaced with 20 $\mu\text{l}$  of 0.1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in 55mM iodacetamide. The solution is then incubated at room temperature for 30 min in the dark. The iodacetamide is removed and replaced with 0.2 ml of 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and the spots are again incubated with acetonitrile (were added 200 ml of acetonitrile) at room temperature for 15 min. After 15 min of incubation, the solvent is removed, and the spots were dried in a flow hood for 30 min The gel pieces were then rehydrated with 20 ng / l trypsin methylated in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  with sufficient volume to completely cover the gel pieces, incubated at 37 ° C ON.

### *Identification of proteins with mass spectrometry*

The identification of protein bands from 1-D or 2-D gels is achieved by construction of the peptide map of mass using primarily MALDI-TOF mass spectrometry (Matrix-Assisted laser Desorption Ionization-Time Of Flight) (See the above figure). The protein band was excised from the gel, digested in situ with appropriate proteolytic enzymes and the resulting peptide mixture is directly analyzed by MALDI-MS(174). The identification of proteins is performed using accurate mass values of peptides determined by MALDI-MS.

These values,infact, together with other parameters such as the type of protease used for the hydrolysis of the protein molecular weight or estimated by SDS gel are introduced in some research programs available on the Web(ProFound, MASCOT, MS-Fit, etc.).

The values recorded on the mass spectra are compared with those obtained by theoretical digestion of all proteins of the database allowing the identification of the protein.

This analysis was performed in collaboration with Dr. Alessandra Giorgi, Department of Biochemical Sciences University "La Sapienza" Rome

## RESULTS

### Aging

#### *Regional distribution of carnosinase activity and expression in aged and senescent rat brain*

Expression and enzyme activity of CN1 were investigated in different brain regions of aged and senescent rats (Fig. 1A and B). In aged animals, CN1 expression was threefold higher in the SN compared with all other brain regions examined, which showed comparable activities (Fig. 1A).

Senescent rats, as compared with aged rats, exhibited a significant ( $p < 0.05$ ) increase in CN1 expression in all brain regions but the cortex. Consistent with CN1 protein expression, the enzyme activity was significantly higher in all brain regions of senescent rats compared with that in aged animals, with the maximal induction observed in the SN, followed by the cortex, septum, hippocampus, cerebellum, and striatum (Fig. 1B).

#### *Total sulfhydryl groups and glutathione redox state analysis*

When different brain regions were examined for thiols, total SH groups, and GSH levels, as a function of age, all brain regions but the cerebellum showed a decrease in total SH groups (Fig. 2) as well as GSH in senescent compared with aged animals (Fig. 3A). Conversely, the level of oxidized glutathione (GSSG) increased in senescent compared with aged rats (Fig. 3B). To test the hypothesis that these changes of redox status in the aging brain would trigger a heat-shock response, we measured the expression of inducible



Hsp70 (Hsp72) and HO-1 in different brain regions in aged and senescent rats.

### ***Hsp distribution in brain aging***

Figures 4A and 5A showed that protein expression of Hsp72 and HO-1 was significantly elevated in senescent compared with aged rats in all brain regions examined. Representative Western blots of samples from the hippocampus are shown in Figs. 4B and 5B, respectively. A positive correlation ( $r=0.87$ ) between the decrease in GSH and the increase in Hsp72 expression was observed in all brain regions examined during aging. Increased carnosinase activity in the brain can lead to decreased carnosine levels, with consequent decrease of the GSH=GSSG ratio. This is consistent with the notion that the thiol redox switch acts as a signal for induction of cytoprotective genes modulating cellular stress tolerance.

### ***Hsp90, thioredoxin, and thioredoxin reductase expressions***

We also evaluated levels of expression of Hsp90, thioredoxin (TRX), and thioredoxin reductase (TRX-Red) in the brains of aged and senescent rats. Senescent rats showed, compared with aged rats, a significant decrease of Hsp90 in the cortex and hippocampus, an increase in the SN, but no significant changes were found in the septum, striatum, and cerebellum (Fig. 6A). These changes were associated with a decrease in the thioredoxin protein expression in all brain regions, particularly in the substantia nigra and in the hippocampus, except in the cerebellum (Fig. 7A). Consistently, TRX-Red expression was elevated in senescent rats compared with aged rats in all brain regions examined (Fig. 8A). Representative Western blot analysis of Hsp90, TRX, and TRXRed proteins of samples from hippocampus are shown in Figs. 6B, 7B, and 8B, respectively.

### ***Hydroxynonenal and protein carbonyl analysis***

One measure of oxidative stress in brain aging is protein oxidation. However, lipid peroxidation, indexed by HNE, also can occur in the brain under oxidative stress. HNE, formed from arachidonic acid or other unsaturated fatty acids after free radical attack, binds by Michael addition to proteins, particularly at cysteine, histidine, or lysine residues. Examination of HNE levels in different brain regions in aged and senescent rat brains showed elevation of protein-bound HNE in all brain regions, except in the cerebellum, consistent with higher level of GSH found in the same region (Fig. 9A). In addition, a significant increase in the amount of protein carbonyls ( $p < 0.005$ ) (Fig. 9B), an index of protein oxidation (175), was found in senescent compared with aged animals in all brain regions examined, but not in the cerebellum, confirming HNE data. Representative Western blot analysis of HNE and protein carbonyls of samples from the hippocampus are shown in Fig. 9C and D, respectively.

### **Redox proteomic**

Western blot and subsequent immunochemical detection of DNP adducts allowed identification of carbonylated proteins in the cerebral tissue samples of senescent in comparison with aged rats. We used a parallel approach to quantify the protein levels by Coomassie staining and the carbonyl levels by immunohistochemistry. Coomassie stain achieves a linear and sensitive staining of gel slabs, and immunoblotting with DNP antibody allows specific detection of DNP adducts in hippocampus samples. The

specific carbonyl levels were obtained by dividing the carbonyl level of a protein spot on the nitrocellulose membrane by the protein level of its corresponding protein spot on the gel. Such numbers give the carbonyl level per unit of protein. Figure 10 shows representative 2D-electrophoresis gels of hippocampus from senescent (Fig. 10B) and aged (Fig. 10A) rats after Coomassie staining. Figure 11 shows representative 2D Western blots of senescent (Fig. 11B) and aged (Fig. 11A) rats. Compared with aged rats, senescent animals showed significantly higher levels of oxidation, and the identified proteins were: heat shock protein 90 (Hsp90), cytochrome b-c1 complex subunit 1, creatine kinase, malate dehydrogenase, a-enolase, glutamate dehydrogenase, pyruvate kinase, fructose-bisphosphate aldolase C, ATP synthase subunit alpha, and glutamine synthase. Table 1 shows these proteins as identified by mass spectrometry along with the peptides matched, percentage coverage, pI, Mw values, and increase of specific carbonyl levels, indexed as percentage of control. In senescent rat cortex, creatine kinase B-type, serine/threonineprotein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoforms, aspartate aminotransferase, fructose-bisphosphate aldolase A, peroxiredoxin-2, guanine nucleotide-binding protein subunit beta-1, vacuolar ATP synthase subunit B, Hsp-70 heat shock protein, aldehyde dehydrogenase, pyruvate kinase isozymes M1/M2, ATP synthase subunit alpha, and triosephosphate isomerase were found with significantly higher levels of oxidation than controls (Table 3). In senescent rat striatum, 78-kDa glucose-regulated protein, Hsp-70 heat shock protein, adenylate kinase, elongation factor Tu, pyruvate kinase isozymes M1/M2, aconitate hydratase, triosephosphate isomerase, and glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase showed higher levels of oxidation than in controls (Table 4). All the proteins identified, except for pyruvate kinase isozymes M1/M2, occur in a single spot, being identified as a single spot on the gel, and present a significant P value (<0.05). Table 5 reports the proteins found to be significantly more oxidized in

senescent rats cerebellum than in aged controls. These are heat shock cognate (Hsc) 70 protein, malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, vesicle-fusing ATPase, pyruvate kinase isozymes M1/M2, aspartate aminotransferase, phosphoglycerate kinase 1, voltage-dependent anion-selective channel protein, and adenylate kinase isoenzyme 4. To verify the results obtained through redox proteomics analysis, we performed a validation study on the Hsp70 carbonylation using traditional immunochemistry. Consistently with the proteomics results, the carbonyl levels of Hsp70 were significantly increased by about 40% in cerebral cortex of senescent rats compared with aged rats (Fig. 18).

### **Multiple sclerosis**

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) of unclear etiology, characterized by perivenous infiltration of lymphocytes and macrophage leading damage of myelin and axons in the brain and spinal cord. Clinical disease usually occurs with recurrent and reversible episodes of neurological dysfunction affecting one or several sites, during late adolescence and early adulthood; this form being the most prevalent is called relapsing-remitting form (RR) and was chosen in this study. Table 1 summarizes clinical data of patients and control subjects. As shown, the mean age at disease onset was  $31.4 \pm 9.2$  years with a disease duration of  $3.92 \pm 2.08$  years, a relatively short duration typical of the relapsing remitting form not yet changed into the secondary progressive form. The mean value of Expanded Disability Status Scale (EDSS), which the most used method of quantifying disability in multiple sclerosis, was  $1.5 \pm 1.18$  and this indicates that patients have a low degree of disability linked to the short period of disease. Brain MRI from MS patients presenting two hypointense areas distributed bilaterally on the white matter of the semioval

center (A), enhanced by gadolinium injection (B) is shown in Fig. 19A and B. The heat shock response contributes to establishing a cytoprotective state in a wide variety of human diseases, including inflammation, cancer, aging and neurodegenerative disorders. The vitagene family is composed of the heat shock proteins HO-1 (also called Hsp32), Hsp70, by the thioredoxin system and by sirtuin proteins (177-179). We therefore evaluated the expression levels of cellular stress response proteins in the CSF, plasma and lymphocytes in control and in MS patients. Western blot analysis of CSF probed for heme oxygenase-1 is reported in Fig. 20. HO-1 expression is significantly ( $P < 0.05$ ) increased in the CSF of MS patients, compared to controls. This finding was associated with increased levels of protein oxidation (Fig. 21A) as well as lipid oxidation (Fig. 21C). Protein oxidation was evaluated by measuring the amount of protein carbonyls (DNPH). Protein carbonyls most often are detected by two methods, i.e., derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), followed by immunochemical detection with an antibody against the resulting protein hydrazone, or formation of the Schiff base by biotin hydrazide followed by detection of the protein-bound imine with enzyme- or fluorophore-linked avidin or streptavidin. Here we describe the DNPH-based detection method that is routinely used for detection of carbonylated proteins. In the DNPH method, samples are derivatized with DNPH. DNPH reacts with carbonyl groups to form protein-resident 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNP), which is then detected using commercially available anti-DNP antibodies (Fig. 21B). As shown, protein carbonyls were found at a significantly ( $P < 0.05$ ) higher level in the CSF of MS patients than in control subjects. Furthermore, one measure of oxidative marker is lipid oxidation, indexed by HNE (175,180), which can also occur in brain under oxidative stress (181). HNE, formed from arachidonic acid or other unsaturated fatty acids following free radical attack, binds by Michael addition to proteins, particularly at cysteine, histidine, or lysine residues (181). Examination of HNE levels in the

CSF of MS patients showed a significant ( $P < 0.05$ ) elevation of protein-bound HNE as compared to control group (Fig. 21D). The 70 kDa family of stress proteins is one of the most extensively studied cytoprotective system. Included in this family are the constitutive isoform, Hsc70 (heat shock cognate), and the inducible isoform, Hsp70 (also referred to as Hsp72). Figs. 22 and 23 show a significant ( $P < 0.05$ ) increase in the expression level of Hsc70 and Hsp70, respectively, in lymphocytes of MS patients with respect to controls (Figs. 22A and 23A). Representative immunoblots are also shown (Figs. 22B and 23B). Heme oxygenase-1 (HO-1), also referred to as Hsp32, belongs to the Hsp family and protects brain cells from oxidative stress by degrading toxic heme into free iron, carbon monoxide and biliverdin (140,179). This latter is then reduced by biliverdin reductase (BVR) into bilirubin (BR), a linear tetrapyrrole with antioxidant properties; very recently, BR has been shown to effectively counteract also nitrosative stress, due to its ability to bind and inactivate NO and RNS (120,140). The constitutive isoform of heme oxygenase is HO-2. We evaluated the expression of both isoforms in lymphocytes of MS patients and in controls. As shown in Fig. 24, HO-1 protein expression was higher in MS samples compared to control. Notably, increase in HO-1 was associated with a significant ( $P < 0.05$ ) decrease in HO-2 expression in the same experimental group (Fig. 25). Analysis of lymphocytes in MS patients, compared to control group, revealed also a significant ( $P < 0.05$ ) increase in thioredoxin expression, whereas expression of the related enzyme thioredoxin reductase-1 was decreased (Figs. 26A, B and 27A, B). These changes were associated with significantly ( $P < 0.05$ ) increased formation of protein carbonyls (Fig. 28A and B) and HNE (Fig. 28C and D). Consistently to the observed changes in MS lymphocytes, analysis of plasma in MS patients showed higher and significant ( $P < 0.05$ ) expression levels of HO-1, Hsp60 than in control subjects (Figs. 29 and 30), while no difference was found to a significant extent between the two

experimental groups in Hsp70 protein levels (Fig. 31). Interestingly, we found in the plasma significantly ( $P < 0.05$ ) higher levels of sirtuin-1 protein in MS patients than in control group (Fig. 32). As far as we are concerned this is the first evidence of changes in SIRT- 1 expression in MS, although at the moment we can not exclude that this might not be a specific alteration of this progressive inflammatory neurodegenerative disease.

### **Proteomics and Redox Proteomics**

The proteomic analysis allows the screening of protein modifications in various pathological conditions (176); with two-dimensional electrophoresis and staining with Coomassie blue you can obtain the full mapping of the proteins present in a sample. Map protein 2-D gel image shown in Figure 33 represents an example of protein expression profiles of serum from control subjects and patients with multiple sclerosis Overall, the models of two-dimensional electrophoresis of serum control and MS are similar. However, the statistical analysis ( $p \leq 0.05$ ) relative densities of the spots has allowed us to find 7 spots differently expressed in MS subjects with an increase or a decrease compared with controls at least 1.5-fold.

The proteins identified are: apolipoprotein A-1 up-regulates 7.8 times in the MS group; Ig lambda-2 chain C regions down-regulates 0.22 time in the SM group; Ig K up- regulates 2.11 time in the SM group; Ig K down-regulates 0.0025 time in the SM group; Alpha-1B-glycoproteina Complement component C9 up- regulates 2.4 time in the SM group. Ig gamma-1 chain C region down- 0.42 regulates time in the SM group; Ig gamma-1 chain C region down- 0.092 regulates time in the SM group.

In fig.34 shows an image of a 2-D gels of serum from control subjects and patients with multiple sclerosis in which the spots are marked differently expressed proteins.

The spots of these proteins were excised from the gel, digested with trypsin and then analyzed by MALDI technique. The results of mass spectrometry were used to identify proteins using the program Mascot Search Engine and are reported in Table 5

The formation of carbonyl groups and the determination of the degree of protein oxidation was carried out by redox proteomics

The two-dimensional map and the subsequent immunochemical detection of DNP-adducts showed carbonyl proteins in serum samples from patients with multiple sclerosis. Parallel to the immunochemical determination of carbonyls levels were measured by protein staining with Coomassie blue.

The two-dimensional electrophoresis and staining with Coomassie blue made it possible to obtain the total mapping. protein present in the sample and immunoblotting with anti-DNP has identified specific DNP-adducts in serum samples corresponding to proteins on the gel. The level of carbonyl groups per unit of protein was obtained dividing the level of protein carbonyls instead of a spot on the nitrocellulose membrane with the level of its corresponding spot on the gel spots.

The Figure 35 shows a representative imagine of 2D WB of serum from control subjects and patients with multiple sclerosis Compared with controls, serum of MS subjects show a significantly oxidized protein, haptoglobin. The arrow indicates the specific spots where you highlight a all'oxiblot immunoreactivity (through the program PDQuest 2D image analysis) significantly higher in MS subjects compared with control subjects. Table 1 shows the protein identified by mass spectrometry, the number of peptides corresponding to the database, the percentage of coverage, the pI, the values



of the PM and increased levels of specific carbonyl groups indexed as a percentage of control.

### **3. Antioxidant and neuroblastoma cells**

The cytoprotective effects dell'antiossidante HBB2 were assessed by cell viability studies in vitro models of human neuroblastoma cells in type SH-SY5Y subjected to treatment with the oxidizing agent peroxynitrite donor SIN-1. Figure 37 shows the cell viability after treatment with SIN-1 (1 mM) (7h) in the presence and absence of pretreatment with HBB2 (-24h), at various concentrations (2 $\mu$ M, 10 $\mu$ M), and HBB2 (2 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) alone for 24 hours

According to previous studies(182) treatment with SIN-1 (1 mM) significantly reduced cell viability by exerting a cytotoxic effect compared to untreated cells or subjected to treatment with 2 $\mu$ M HBB2, which reveal, however, an increase of vitality. because it increases the cellular resistance to cytotoxic damage induced by SIN-1(1mM).

It has detected a significant decrease in cell viability after treatment with HBB2(10  $\mu$ M), demonstrating a cytotoxic effect at that concentration. Cell viability after treatment with a dose-response was evaluated HBB2 (2  $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20  $\mu$ M) for 6h and 24h (fig. 36). The results obtained show a significant increase in cell viability compared to controls, at a concentration of 2  $\mu$ M of HBB2 and instead of a cytotoxic effect at higher concentrations(10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M).

Experimental studies suggest the key role played by Hsps in the neuroprotective effects from excitotoxic damage (183). The Fig 38 shows the Western blot analysis of protein expression levels of Hsp72 in SH-SY5Y cells

treated for 7h SIN-1(1mM) in the presence and absence of pretreatment (-24h) with HBB2 (2 $\mu$ M).

These results demonstrate a significant increase compared with controls, protein expression of Hsp72 after treatment with SIN-1.

The cytoprotective effects of L-acetyl-carnitina (LAC) were assessed by cell viability studies type in human neuroblastoma cells SH-SY5Y subjected to treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. oxidant. To determine the concentration required to make experiments on the cytoprotection of neuroblastoma SH-SY5Y cells with the antioxidant(LAC),was assessed cell viability after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dose-response (0,02mM; 0,05mM; 0,1mM, 0,2mM; 0,4mM, 0,8mM, 1mM) for 12 h.

In Fig. 39 shows a graph that shows the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( Equal to 0.2 mM), which has a 50% cell viability to be used for the experimental plan.

Figures 40-41 shows the graph of cell viability after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) in the presence and absence of pretreatment with LAC(6h e12h), at various concentrations(20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M ), and with LAC(20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) alone for 6h. Treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2 mM) significantly reduced cell viability by exerting a cytotoxic effect compared to untreated cells or subjected to treatment with LAC, which reveal, however, an increase of vitality

The pretreatment with LAC-6h (20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) is not sufficient to activate the cytoprotective function of the test compound (Fig. 40), while the 12h pretreatment with LAC (20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) determines a marked cytoprotective effect increasing cellular resistance to cytotoxic damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) (Fig. 41).

Numerous experimental studies indicate the key role played by Hsps in neuroprotective phenomena from excitotoxic damage **(184)**.

In agreement with the cell viability data Fig 5-6 show no activation of the H-1 and Hsp70 in cells pretreated with LAC to 6h(20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM)(-1h). The graphs in Fig.44 -45 show levels of protein expression of Hsp-70 and HO-1 in SH-SY5Y cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2 mM) (-1h), in presence and absence of pretreatment (12h) with LAC (20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M).

The results on neuroblastoma cells show significant changes in protein expression of Hsp70 compared with controls and cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) only in cells pretreated with LAC at a concentration of 50 $\mu$ M (12h) and H-1 at a concentration of 20 $\mu$ M and 50 $\mu$ M of LAC.

These results support the hypothesis that L-acetylcarnitine up-regulating the system of vitageni may limit the consequences associated with nitrosative and oxidative stress to aging and age-related diseases.

#### **4. Carnosina e lesione al midollo spinale (SCI)**

The heat shock response was contributing to a cytoprotective took office in a wide variety of human diseases particularly during aging and neurodegenerative disorders(177,179).In this respect, levels of inducible Hsp70 expression were also measured as markers of oxidative stress in animals exposed to SCI in the absence or in the presence of treatment with D-carnosine or L-carnosine and compared to control sham operated mice.

Compared to control mice (Fig. 46A and B), Hsp70 expression significantly increased in the SCI + saline mice group, whereas treatment with D-carnosine (150 mg/kg), but not L-carnosine, decreased significantly the SCI-induced increase of Hsp70 expression .

These results demonstrate that there are large differences between D- and L-carnosine carnosine. The carnosine derivatives show antioxidant

properties similar to those of the parent dipeptides. In addition, these new compounds survive to attack by

carnosinases. Derivatives of carnosine may be studied as potential therapeutic agents useful to limit the deleterious effects of oxidative stress and nitrosative associated with neurodegenerative disorders and aging. These results demonstrate the importance of the cellular response to stress in the mechanisms of defense against the neurotoxic insult

## **DISCUSSION**

Mitochondrial dysfunction is characteristic of several neurodegenerative disorders(185-188), and evidence for mitochondria being a site of damage in neurodegenerative disorders is partially based on decreases in respiratory chain complex activities in Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), and Huntington's disease (HD). (187).

New evidence suggest that oxidative damage are implicated in the pathogenesis of multiple sclerosis, .

New evidence supports the involvement of oxidative damage in disease multiple sclerosis and indicates that antioxidative endogenous system function less in subjects with SM..mitochondrial damage caused by lipid peroxidation can determine higher production of oxygen (ROS) (189,190).

Such defects in respiratory complex activities, possibly associated with oxidant/antioxidant balance perturbation(191,192), are thought to underlie defects in energy metabolism and induce cellular degeneration.

### **Aging**

Mammalian aging is characterized by a gradual and continuous loss, starting at full adulthood, of the quality of physiologic functions and responses. Losses appear to be more marked in the functions that depend on the integrated response of the central nervous system than in the functions of the renal or cardiovascular systems (193, 194). In the present study, we expressed and purified a recombinant form of human carnosinase (CN1; EC

3.4.13.20), with a fast protocol that can allow the preparation of substantial amounts of this enzyme in a short time.

Polyclonal monospecific antibodies to CN1 also were prepared in rabbit. A stable cell clone was established, expressing constant levels of the enzyme. The use of these tools is a necessary prerequisite to the study of the molecular features of the enzyme and to the elucidation of its role in cell physiology and in pathologic events, with special attention to the redox equilibrium in nerve cells. CN1 is indeed an enzyme found almost exclusively in brain tissue and serum (195). It has been suggested that the relatively high concentrations of this enzyme in human brain and CSF indicate that it may be synthesized in the brain and secreted into the CSF (195). Here we report an increased expression and activity of carnosinase (CN1) in the aging brain. Notably, the maximal induction was observed in the SN and hippocampus, which are brain regions highly vulnerable to oxidant injury and aging effects. This may have important pathophysiologic implications, in light of the possibility that an increased expression and activity of CN1, by decreasing carnosine levels, can result in a significant decrease in antioxidative potential occurring during aging, as corroborated by a large body of literature. Aging is characterized by a general decline in physiological functions that affects especially the brain, which is particularly susceptible to the effects of oxidant injury. In this context, increasing evidence supports the notion that reduction of cellular expression and activity of antioxidant proteins and the resulting increase of oxidative stress are fundamental causes of the aging processes and neurodegenerative diseases (196,198). Reduced glutathione (GSH) is the most prevalent nonprotein thiol in animal cells. De novo and salvage synthesis of GSH maintains a reduced cellular environment in which the tripeptide is a cofactor for cytoplasmic enzymes and can act as an important posttranslational modifier in a number of cellular proteins (199). Owing to the cysteine thiol, it reacts as a nucleophile with exogenous and endogenous

electrophilic species. As a consequence, reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) are frequently targeted by GSH in both spontaneous and catalytic reactions (200). Because ROS and RNS have defined roles in cell-signaling events as well as in human disease pathologies, an imbalance in expression of GSH and associated enzymes has been implicated in a variety of pathologic conditions (201). Thus, impaired function of the CNS in aged animals is associated with increased susceptibility to the development of many neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (193,202). In the present study, we show that oxidative stress increases during aging in the brain, as revealed by decreased GSH content and increases in GSSG, as well as in lipid and protein oxidation markers, such as hydroxynonenals and protein carbonyls. These changes were particularly significant ( $p < 0.05$ ) in the brain regions of hippocampus and SN, and to a lesser extent in the cortex, septum, and striatum, whereas the cerebellum exhibited high resistance to these oxidative changes. Relevant to theory of aging, this is consistent with experimental findings showing that the hippocampus is atrophied during aging and in some neurologic diseases, all processes associated with memory and cognitive impairments (203, 204). Moreover, patients with early to moderate AD have a 25% decrease in hippocampal volume compared with that in healthy controls (204,205) and show postmortem marked ultrastructural damage in hippocampal neurons, especially in mitochondria (206). The most prominent biochemical symptom of aging and many age-related conditions is proteotoxic stress, resulting from the accumulation of altered proteins that arise from biosynthetic errors or deleterious postsynthetic polypeptide modifications or both (207). Cells respond to sublethal heat stress by preferential synthesis and accumulation of several members of functionally and compartmentally distinct families of heat shock (or stress) proteins (such as Hsp70, Hsp90, hsp60, and heme oxygenase-1 (HO-1)). Expression of the

genes encoding Hsps has been found in various cell populations of central nervous system (CNS), including neurons, glia, and endothelial cells (5). In the nervous system, Hsps are induced in a variety of pathologic conditions, including cerebral ischemia, epilepsy, trauma, and neurodegenerative and metabolic disorders (21). We found that the level of Hsp72 in senescent rats was significantly higher than that in aged rats, with the highest profile of expression in the hippocampus and SN, followed by the septum, cerebellum, cortex, and striatum. Similar patterns of expression as a function of aging were observed when testing for HO-1, indicating that these cytoprotective genes work together in the setting of cellular stress response. In addition, we show, also in aging brain, an increased expression of thioredoxin reductase, the latter possibly related to the decreased thioredoxin protein expression measured in all brain regions investigated. Although the expression of these two genes is known to be coordinately regulated, in our experimental conditions, a lack of coordination was found, consistently with that observed in AD brains (208). Interestingly, we found in the hippocampus a significant correlation between upregulation of Hsp72 and HO-1 and decrease in the content of protein sulfhydryl groups, which followed parallel changes in GSH=GSSG redox states, confirming the generally accepted role of the redox state as a signal for the activation of protective responses, such as the synthesis of heat-shock proteins. Taken together, these results suggest that the expression of Hsps increases with age and occurs as a consequence of redox state perturbation, and this may have a role to limit the deleterious consequences associated with protein denaturation. In addition, we found, in senescent rats, compared with aged controls, a significant decrease of Hsp90 expression in the brain regions of the hippocampus and in the cortex, whereas in the SN, Hsp90s were upregulated. This finding may be relevant to theories connecting aging to neurodegenerative disorders, as molecular chaperone Hsp90 has been demonstrated to be a target for S-nitrosylation, and S-



nitrosylation of Hsp90 abolishes ATPase activity that is necessary for its chaperone function. Thus inactivation of Hsp90 may allow accumulation of tau and amyloid- $\beta$  aggregates in the degenerating brain. In addition, increasing evidence supports the notion that inhibition of Hsp90 led to decreases in p-tau levels, suggesting that blockade of the Hsp90-mediated refolding pathway promotes p-tau turnover, through degradation. Remarkably, peripheral administration of a novel Hsp90 inhibitor promoted selective decreases in p-tau species in a mouse model of tauopathy, further suggesting a central role for the Hsp90 complex in the pathogenesis of tauopathies. In keeping with this notion, the decrease in Hsp90 expression observed in cognitive brain regions, such as the cortex and hippocampus, may be viewed as a compensatory mechanism to limit the deleterious consequences associated with pathologic hyperphosphorylation, such as that observed in AD brain and the SAMP8 mouse model of senescence (209). Therefore, pharmacologic modulation of cellular stress pathways is an emerging area in the treatment of human diseases, not only neurodegenerative disorders, but also cardiovascular disease and cancer. Relevant to this, we devoted our recent interest to the development of nutritional interventions able to target redox-sensitive cytoprotective vitagenes involved in the homeostatic control of so-called longevity-assurance processes. Dietary antioxidants, such as polyphenols, carnitines, and carnosine have recently been demonstrated in vitro to be neuroprotective through the activation of hormetic pathways, such as those including vitagenes (119, 140, 196, 197). Carnosine, in particular, it has been demonstrated to possess NO free-radical scavenging ability and NO-trapping capacity in cell-free experiments (210) and also is able to prevent, in astrocytes, the upregulation of iNOS and the induction of both HO-1 and Hsp70 after nitrosative stress (211). Here we found that the increase of carnosinases increases the susceptibility to toxic effects of oxidative stress, and this may be relevant to the free-radical theory

of aging. In view of the finding that (a) neuronal NOS is increased in aging brain, (b) carnosine has been found to protect cells from  $\beta$ -induced toxicity (212, 213) in AD, and that (c) plasma levels of carnosine are lower in AD patients than in age-matched controls (214), it is conceivable that the increase in carnosinase that shows regional specificity, is a factor contributing to age-related pathogenesis, which affects, with different severities, various regions of the aging brain. Relevant to this, histidine containing dipeptides resistant to carnosinase hydrolysis have been recently developed (215-217), and their pharmacological application to neurodegenerative pathologies suggested.

Thus, impaired function of the central nervous system (CNS) in aged animals is associated with increased susceptibility to the development of many neurodegenerative diseases, such as AD, PD, and ALS (140,196,197).. Oxidatively damaged proteins are known to increase markedly with age (218-220). In addition the loss of protein sulfhydryl groups and the reduced activity of important metabolic enzymes have been documented to occur in brain as a function of aging (221-223). Studies on the induction of the HSP response, a cytoprotective mechanism to counteract oxidative damage, showed a regional specificity indicating that different brain areas might undergo oxidation differently and react to protect themselves based on the strength of the insult (151,186,224). Here we used a redox proteomics approach to identify the oxidatively modified proteins in four different brain regions of 28-month-old rats compared with 12-month-old rats. Interestingly, most of these proteins are involved in energy metabolism pathways, including ATP production, glycolysis, and the Krebs cycle. In addition, protein oxidation also affected components of the cell involved in cell structure, signal transduction, and the cellular stress response, such as Hsp70. The 70-kDa family of stress proteins includes the constitutive form of Hsp70, which includes Hsc70; the inducible form of Hsp70 (also referred to as Hsp72); and GRP78 (a constitutively expressed glucose-regulated protein found in the endoplasmic reticulum(5,

225); and is a family of chaperone molecules contributing to cellular protection against a variety of stresses by preventing protein aggregation, assisting in the refolding of damaged proteins, and chaperoning nascent polypeptides along ribosomes. Hsp70 shows very low expression levels in brain under physiological conditions, but it is induced after certain oxidative stresses. Hsp70 is present in cytosol, nucleus, and endoplasmic reticulum (Calabrese et al., 2004). Inducible Hsp70 (Hsp72) has been found to have the highest levels in the substantia nigra, followed by septum, cerebellum, striatum, hippocampus, and cortex (186,224,226). Hsc70 is a constitutive isoform, recruited by the cell as a primary defense against unfavorable conditions. Previous studies in aged rats found that the basal level of Hsc70 was significantly higher in the substantia nigra, followed by septum and hippocampus, striatum, and cerebellum, with lowest levels in the cortex (226). Glucose-regulated protein 78 (GRP78) acts as a molecular chaperone by binding transiently to proteins crossing through the ER and helping their folding, assembly, and transport. GRP78 is the main constituent involved in the unfolded protein response. Decreased functionality of GRP78 can lead to a decreased activity of the proteasome, with consequently enhanced misfolded protein inside the cell (227). Our findings on the oxidative modifications of these chaperone molecules in striatum, cerebellum, and cortex could lead to an increased accumulation of misfolded proteins, one of the main, common traits occurring in aging and neurodegenerative disorders (228-233). In the present study, we have identified several proteins that were significantly more oxidized in the brains of senescent vs. aged rats. The oxidatively modified proteins are in some cases similar to those found in AD brain (234-236), thus confirming that aging is a major risk factor for developing neurodegenerative diseases. Although the etiologies are different and likely multifactorial, aging and age-related neurodegenerative diseases share some common pathological mechanisms, among which energy failure is one of the most crucial for

neuronal dysfunction (237). In addition, the animal model of aging used in this study, which is based on naturally occurring phenotypes, may be particularly useful for the identification of biological markers and to provide new insight into the molecular mechanism of brain development, aging, and neurodegeneration.

### **Multiple sclerosis**

Multiple sclerosis is a relatively common and etiologically unknown disease with no cure. It is the leading cause of neurological disability in young adults, affecting over two million people worldwide. Traditionally, MS has been considered a chronic, inflammatory disorder of the central white matter in which ensuing demyelination results in physical disability (238). Recently, MS has become increasingly viewed not only an inflammatory disease, but also a neurodegenerative disorder in which axonal injury, neuronal loss and atrophy of the central nervous system lead to permanent neurological and clinical disability (239-241). There are three main types of MS, defined as: relapsing-remitting (RR), secondary progressive (SP) and primary progressive (PP) with progressive-relapsing (PR) recently distinguished as an additional subtype. There is evidence that MS is characterized not only by immune mediated inflammatory reactions but also by neurodegenerative processes . A variety of studies, supporting a role for oxidative stress in MS, indicate that endogenous antioxidants are decreased in MS, and damage to mitochondria induced by lipid peroxidation can lead to further ROS generation. However, up-regulation of antioxidants in astrocytes and macrophages in active MS lesions as well as in leukocytes suggests that endogenous protection from oxidative damage could limit the deleterious consequences of the oxidative stress per se (238,242). Interestingly, exogenously administered antioxidants have shown some beneficial effects in animal studies of MS but no clinical studies support the use of such therapy (243-246). Furthermore, the possible

links between MS and redox balance perturbation is indicated by increased malonaldehyde and F2-iP levels in MS patients as compared to control individuals with other neurological disorders and, in addition, an inappropriate expression of Hsps on oligodendrocytes (117,247,248). This last event could represent a possible initiating factor at the level of MS lesions, capable of modulating the subsequent susceptibility or resistance of cells to oxidative stress. In a previous report we have demonstrated high levels of NO, peroxynitrite, and superoxide in spinal fluid from patients with MS (111,115). Activated glia secrete RNS products of NO metabolism with superoxide radicals ( $O_2^{\cdot-}$ ) to form peroxynitrite anion ( $ONOO^-$ ). RNS can cause nitrosative stress, which results in the destruction of myelin and (myelin-forming) oligodendrocyte cells (249). Furthermore, the formation of S-nitrosoglutathione (GSNO) can cause GSH depletion, and hence trigger redox dependent changes in cellular signaling as well as modification of key intracellular enzymes, such as chain respiratory complex activities (250). In this study, significant increases in oxidative stress markers, such as carbonyls and HNE were found in the CSF, peripheral lymphocytes and plasma of MS patients, as compared to control subjects. These changes were associated with induction of stress responsive proteins, such as HO-1, Hsp72, Hsp60 and thioredoxin (TRX), measured in CSF, lymphocytes and in plasma. Heme oxygenase is the rate-limiting enzyme in the production of bilirubin. In the past decade the heme oxygenase (HO) system has been focused for its potential significance in maintaining cellular homeostasis. It is located in the endoplasmic reticulum in a complex with NADPH cytochrome c P450 reductase. The reaction catalyzed by HO is the oxidative cleavage of the heme molecule to form biliverdin and carbon monoxide (CO). Iron is reduced to its ferrous state through the action of NADPH cytochrome c P450 reductase. (193). Further degradation of biliverdin to bilirubin occurs through the action of a cytosolic enzyme, biliverdin reductase (251). HO-1 is present in various

tissues with the highest activity in the brain, liver, spleen, and testes. There are three isoforms of heme oxygenase, HO-1 or inducible isoform, HO-2 or constitutive isoform, and the recently discovered HO-3, cloned only in rat to date(21,119,149,225,252).

Elevation of HO-1 expression and activity in MS is probably due to elevated oxidative stress. This finding is consistent with evidence suggesting that the HO-1 gene is redox regulated and, similar to other antioxidant enzymes, this occurs because it contains in its promoter region the antioxidant responsive element (ARE) (252). Therefore, the HO-1 gene undergoes a redox sensitive modulation by transcription factors recognizing specific binding sites within the promoter and distal enhancer regions of the HO-1 gene (120,121).

In addition, heme oxygenase-1 is rapidly upregulated by oxidative and nitrosative stresses, as well as by glutathione depletion (253). It has been also suggested that inappropriate stress response within the CNS could influence both the permeability of the blood– brain barrier and the expression of Hsps, thereby initiating the MS lesion (193, 241,254). In addition, cytokines, immunoglobulins, and complement complexes may elicit a survival response involving the induction of endogenous Hsps and other protective molecules, which indicates that redox dependent mechanisms in these cells are of great importance in MS (255-257). The heat shock response contributes to establish a cytoprotective state in a variety of metabolic disturbances and injuries, including stroke, epilepsy, cell and tissue trauma, neurodegenerative disease, and aging (121,258). In mammalian cells, the induction of the heat shock response requires the activation and translocation to the nucleus of one or more heat shock transcription factors (HSFs), which control the expression of a specific set of genes encoding cytoprotective Hsps (193, 241).

Production of Hsps is essential for the folding and repair of damaged proteins, serving thus to promote cell survival. Hsps serve as chaperones that

bind to other proteins and regulate their conformation, regulate protein movement across membranes or through organelles, or regulate the availability of a receptor or activity of an enzyme. The 70-kDa family of stress proteins is one of the most extensively studied. This family comprises Hsc70 (heatshock cognate, the constitutive form), Hsp70 (the inducible form or Hsp72), and GRP75 (a constitutively expressed glucose-regulated protein found in the endoplasmic reticulum). After a CNS injury, Hsp70 is synthesized at high levels and is present in the cytosol, nucleus, and endoplasmic reticulum (193). Hsp60 chaperone proteins within mitochondria and, also, protect brain cells against ischemia and seizures in vivo, after viral-induced overexpression [18]. Hsp60 is encoded in the nucleus and resides mainly in the mitochondria. Hsp60 forms the chaperonin complex, which is implicated in protein folding and assembly within the mitochondria under normal conditions. Hsp60 together with its cochaperonin Hsp10 produce a large, efficient protein-editing machinery that facilitates proper folding and assembly of mitochondrial-imported proteins and corrects misfolded polypeptides generated under mitochondrial oxidative stress (259). Mutations in the HSPD1 gene encoding Hsp60 have recently been found to underlie spastic paraplegia 13, an autosomal-dominant spinal-cord neurodegenerative disorder of late onset, characterized by progressive weakness and spasticity of the lower limbs, and, more recently, a homozygous missense mutation, D29G, in HSPD1, encoding the mitochondrial Hsp60 chaperonin, causing a mitochondrial Hsp60 chaperonopathy linked to brain hypomyelination and leukodystrophy (260).

This finding provides evidence for the pivotal role of the mitochondrial Hsp60 chaperonin in the process of normal brain myelination and in the pathogenesis of hypomyelinating neurodegenerative disease. Notably, we found increased expression of thioredoxin in MS as compared to control subjects. To date this is the first report demonstrating changes in

thioredoxin/thioredoxin reductase protein levels in MS patients. Thioredoxin (TRX) represents an intracellular redox regulator that has been shown to be important for the regulation of redox-sensitive transcription factors (5). In its reduced state TRX can oxidatively reactivate inactive transcription factors such as Jun, Fos, AP-1, redox factor-1 (ref-1), and Nrf-2 (260). Thioredoxin reductase (TRXr) is a flavoprotein that catalyzes the NADPH-dependent reduction of oxidized thioredoxin protein. It is usually located in the cytosol, but it translocates into the nucleus in response to various stimuli associated with oxidative stress. TRXr plays a pivotal role in protecting against oxidative stress and in regulating cell growth and cell death. Constitutive TRXr expression has been observed in several cell types of the mammals, including neuronal cells after nitrosative stress. Both *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated that TRX and TRXr have protective roles against cytotoxicity mediated by the generation of ROS (196). Notably, in our study we demonstrate that thioredoxin reductase is decreased in MS lymphocytes. This may be relevant to the pathogenesis of MS, as we have previously demonstrated in CSF and plasma of MS patients a significant decrease of GSH/GSSG ratio (111, 115). Consistent with this notion, it is well established that cellular redox regulation of many processes is provided by the cooperation between the Trx and glutathione systems (261). In fact, Trx and GSH systems are involved in a variety of redox-dependent reactions, such as supplying reducing equivalents for ribonucleotide reductase, and peptide methionine sulfoxide reductase, the latter being involved in antioxidant defense and regulation of the cellular redox state(196). Therefore, Trx and GSH form a powerful system controlling redox regulation of gene expression, signal transduction, cell proliferation, protection against oxidative stress, anti-apoptotic functions, growth factor and co-cytokine effects, as well as regulation of the redox state of the extracellular environment. In addition, increased Trx-1 expression has been described in many human primary



cancers and tumor cell lines. Changes in MS redox status observed in this study were reflected also by the interesting finding that Sirtuin-1 is present in the plasma of MS patients at significantly higher levels compared to control subjects. As far as we are concerned this is the first evidence of increased Sirtuin-1 expression in the blood of MS patients. Sirtuins are a family of histone deacetylase, that, in humans, includes at least seven members, with different cellular and subcellular localization and substrate binding activity. The most studied is the SIRT1, a NAD<sup>+</sup> dependent enzyme, involved in deacetylation of different proteins and in the regulation of energy metabolism and redox state. Sirtuins are involved in the regulation of important biological processes, such as apoptosis, cell differentiation, energy transduction, glucose homeostasis , as well as in mediating enhancement of synaptic plasticity and neurogenesis in response to exercise, dietary energy restriction, and other hormetic environmental factors (5,103, 104,105, 121). Because of their roles in cellular stress responses, sirtuins would be expected to play particularly important roles in adaptive responses of neural cells to stress, such as that associated with the MS pathogenesis. In support of this conceivable possibility, SIRT1 has been shown to interact either directly or indirectly with several pathways known to be involved in adaptive neural plasticity, including the Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-cyclic adenosine monophosphate (AMP) response element binding protein and NF-κB systems (121). Thus, our finding may be relevant to the MS pathogenesis, in view of the fact that SIRT1 are emerging as a promising candidate target for therapeutic interventions in metabolic and neurodegenerative disorders (260). MS is a progressive inflammatory neurodegenerative disease exhibiting a variable clinical presentation which has no ‘diagnostic’ laboratory test; this often results in delays to definite diagnosis. In confronting the disease, early diagnosis and appropriate, timely therapeutic intervention are critical factors in ensuring favorable long-term outcomes. The availability of reliable biomarkers could

radically alter our management of MS at critical phases of the disease spectrum. Identification of markers that could predict the development of MS in high-risk populations would allow for intervention strategies that may prevent evolution to definite disease. Ongoing work with biomarkers that reflect drug bioavailability and factors that distinguish between medication responders and non-responders are also under investigation. Pharmacological modulation of cellular stress pathways has emerging implications in the treatment of several human diseases. Consistent with this notion, inactivating polymorphisms of genes encoding detoxification enzymes, such as NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), has been recently reported to be associated with increased susceptibility to MS, suggesting a possible role for the NQO1 genetic background in the development of primary progressive MS [68]. Based on the overlapping inducibility of the cytoprotective phase 2 response and the vitagene network, there is now proven explanation for sensing mechanism of the initial chemical signal that ultimately leads to enhanced gene expression. Thus, modulation of endogenous cellular defense mechanisms via the stress response signaling represents an innovative approach to therapeutic intervention in diseases causing tissue damage, such as neurodegeneration. This is accomplished by a complex network of the so-called longevity assurance processes, which are composed of several genes termed vitagenes (121). Maintaining or recovering the activity of vitagenes through nutritional interventions or specifically active drugs will help uncover novel clues for neuroprotective therapeutic strategies with relevance for clinical applications well beyond the field of MS alone.

### **Proteomica SM**

Recent studies both in clinical and animal leads us to say that NO and peroxynitrite are involved in the pathogenesis of MS (18).

The opportunity to study the complex functions of these glial cells and see how they interact with cells of the immune system is crucial to find a way to contain the damage to myelin and to survive in the damaged tissue. The possible relationship between MS and disturbed cellular redox balance is supported by several factors: the increased incidence of MS in populations that consume high amounts of animal fats that contain low levels of vitamin E which is associated with vegetable fats (262); high levels of dinitrophenyl groups (DNP) in gray and white brain matter of patients with MS (263); high levels of 4-HNE in plaques of the brains of people with MS (264); malonaldehyde high levels in the blood and low activity of glutathione peroxidase in lymphocytes, erythrocytes and granulocytes of patients with MS (265); a decrease of sulfhydryl groups and an increase in lipid peroxidation products in CSF and plasma of patients with MS (266, 267); expression of Hsp-72 in the brains of patients with MS associated with the myelin basic protein (MBP) (268); HO-1 expression in human astroglial cells where it is induced by MBP (269) In addition, there was an altered expression of hsps in oligodendrocytes (270).

This last event could be a possible causative factor in MS lesions capable of modulating the susceptibility to oxidative stress.

Nitrosative stress in astrocytes isolated in vitro produces a change in the pool of endogenous thiols associated with the induction of Hsp-32 (heme oxygenase-1) which is inhibited by antioxidants.

These data support the conclusion that there is a correlation between oxidative stress, sulfhydryl function and pathway of heat shocks (158) and that the central nervous system active compounds from the point of view as the glutathione and the overall balance between oxidant and antioxidant chemical species, redox potential is of great importance in MS (24).

In this study we used a proteomics approach and redox proteomics to identify proteins differently expressed, respectively, and oxidized in the serum of patients with multiple sclerosis.

These results show seven differently expressed proteins in serum samples of MS compared with CTR and a protein oxidized: these proteins are involved in lipid metabolism and inflammatory response. In agreement with data reported in the literature these results show a high level of expression in the MS subjects of  $\alpha$ -1-glycoprotein, complement C9, apolipoprotein-A1 (apoA1) in addition to immunoglobulins (271).

Has been shown that apoA1 plays an important role in lipoprotein metabolism of the central nervous system. ApoA1 is the major apolipoprotein associated with HDL. ApoA1 deficiency in man leads a phenotype with low levels of plasma HDL and premature atherosclerosis (272). ApoA1 knockout mice show a marked reduction in plasma levels of HDL (273, 274) which is reflected in the levels of cholesterol in plasma (275).

The  $\alpha$ -1-glycoprotein and complement C9 involved in the inflammatory response, although not familiar with their function. High levels of expression dell' $\alpha$ -1-glycoprotein have also been found in several studies on liquid celebrate cord (CSF) of patients with multiple sclerosis (276-279).

Our data show additional dell'aptoglobina oxidation at the level of carbonyl groups. In plasma, haptoglobin has the task of binding, irreversible, free hemoglobin released from erythrocytes thus facilitating its removal and inhibiting its oxidative activity. In inflammatory neurological diseases were observed altered levels of haptoglobin (280).

The results of this study support the possible involvement of ROS and RNS in the pathogenesis of Multiple Sclerosis in the peripheral circulation.

Oxidative stress in the peripheral blood of patients with MS may be a consequence of that found at the central level and confirms once again that

reactive oxygen and nitrogen species play a central role in the pathogenesis of these neurodegenerative diseases. The study may form the basis of new experiments aimed at identifying potential targets for neuroprotective therapy able, if administered properly, to prevent or limit damage due to oxidative stress

### **Antioxidants and Cells**

An efficient functioning of maintenance and repair processes seems to be crucial for the survival and physical quality of life

This is maintained by a complex network of so-called longevity assurance processes, made from *vitagenes* (4,178). Among them, The chaperonin proteins are highly conserved and responsible for the preservation and repair of the correct conformation of cellular macromolecules such as proteins, RNAs and DNA (281). The chaperonins along with heat shock proteins whose function is to protect cells from a variety of toxic conditions such as extreme temperatures, oxidative stress, viral infections, and exposure to heavy metals or cytotoxic (282-284).

Chaperone-buffered silent mutations can be activated during the aging process Phenotypic characteristics of lead exposure is not yet manifested themselves, and contribute onset of polygenic diseases such as age-related disorders, atherosclerosis and cancer (285).

In addition, Emerging experimental evidence emphasize the crucial role of heme oxygenase-1 (HO-1) as an integral system, inducible and redox-sensitive, responsible for cellular resistance to stress

HO-1 induction, that occurs with the induction of other Hsps during various pathophysiological conditions, by generating the vasoactive molecule

carbon monoxide (CO) and the potent antioxidant bilirubin, could represent a protective system potentially active against brain oxidative injury (286, 287).

Thus, the induction of Hsps is used by the cell in repair processes following damage to different to prevent the damage caused by the accumulation of proteins, which have lost their function. In addition, this system has recently been considered as biological markers for the detection of physiological and stress conditions fisiopatologico (288). In recent years, there has been a growing interest in identifying new pharmacological strategies to enhance the defense mechanisms through activation of multiple genes of antioxidant defense. Numerous epidemiological studies have shown a strong relationship between food intake, incidence and severity of chronic diseases, leading to the conclusion that chemicals derived from the diet (through modulation of the expression of target genes) may affect the financial health-illness playing a key role in the onset, progression, and severity of chronic (289).

Acetyl-L-carnitine has been proposed as a therapeutic agent in several neurodegenerative disorders (17, 254). It was reported that this compound, in nonhuman primates, prevents the neurological damage caused by methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the substantia nigra, the increase in cellular respiration, mitochondrial membrane potential and the levels of cardiolipin in hepatocytes of rats of 24 months of age (17). These data suggest that the system of carnitine is involved in repair processes and stabilization of membranes and metabolism of disintegration dell'acil-CoA as the acylcarnitine (178).

Acetyl-L-carnitine, as well as carnitine attenuates neuronal damage produced by the acid 3-nitropropionico from rotenone and MPTP (17).

In addition, the LAC induces a more rapid recovery of the levels of ATP, PCr and lactate in rats after ischemia. The results of this research have

shown that in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) subjected to oxidative stress treatment with the LAC not only increases the percentage of cell viability, but also induces the activation of heat shock proteins. The Hsp-70 is encoded in the nucleus, but reside in both the cytosol and in mitochondria (17).

The Hsp-70 in normal form of the chaperonin complex which is involved in protein folding and nell'asseblaggio within the cytosol, but also in cell organelles as the endoplasmic reticulum and mitochondria (290). Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol, but can be transferred to the organelles in the folded state (290). During the translocation of proteins interact with Hsp-70. The ATP-dependent binding and release of Hsp-70 provides greater strength for the complete transport of polypeptides into the mitochondrial matrix . Most of the polypeptides are released from Hsp-70-soluble However, a subset of polipentidi aggregates can be transferred from the Hsp-70 Hsp-60 during the folding (291).

Having to close the functional interactions between these two systems of chaperonins, it is likely that the upregulation of Hsp-70 is a key target site for the action of LAC consequently that restores the functions of the mitochondrial complex.

These experimental results show that the LAC plays a crucial role in the regulation of vitageni. Together, these results confirm that the cellular response to stress can be considered as targets for new therapeutic interventions and can be focused on the antioxidant capacity of some nutritional components such as polyphenols. L-carnosine and its related peptides and L-acetilcarnosina can adjust the system vitageni to limit the deleterious consequences associated with nitrosative and oxidative stress to aging or other neurodegenerative disorders (292).

## SCI

Several studies have implicated the formation of reactive species of oxygen and nitrogen in the secondary neuronal damage of SCI (293). In particular, it has been demonstrated that peroxynitrite probably contributes to secondary neuronal damage through pathways resulting from the chemical modification of cellular proteins and lipids (293). To confirm the pathological contributions of peroxynitrite to secondary damage after SCI, we have evaluated nitrotyrosine formation in the injured tissue.

Nitrotyrosine formation was initially proposed as a relatively specific marker for the detection of the endogenous formation “footprint” of peroxynitrite (294).

Therefore, increased nitrotyrosine is considered as an indication of “increased nitrosative stress” rather than a specific marker of the peroxynitrite generation. This finding is also corroborated by elevated expression of Hsp70 which we found in SCI operated mice, in agreement with the notion that Hsp70 expression is triggered by signals of oxidative and/or nitrosative stress.

. Results of our study reveal as induction of Hsp70 are reduced in SCI-operated mice treated with D-carnosine. Notwithstanding its properties of scavenging the NO-free radical and the induction of Hsp70 following strong nitrosative conditions., L-carnosine do not show these effects in SCI-operated mice. The reason of such different behaviour between L and D-carnosine in our experimental model might be ascribed to their different hydrolysis rate in vivo. Because D-carnosine is not hydrolyzed by the carnosinases, the enzymatic action in vivo would prevent L-carnosine, but not D-carnosine, from showing their protective effects after SCI.

In the last decade, several studies have been performed to understand the biological functions played by carnosine-related dipeptides in the nervous system.



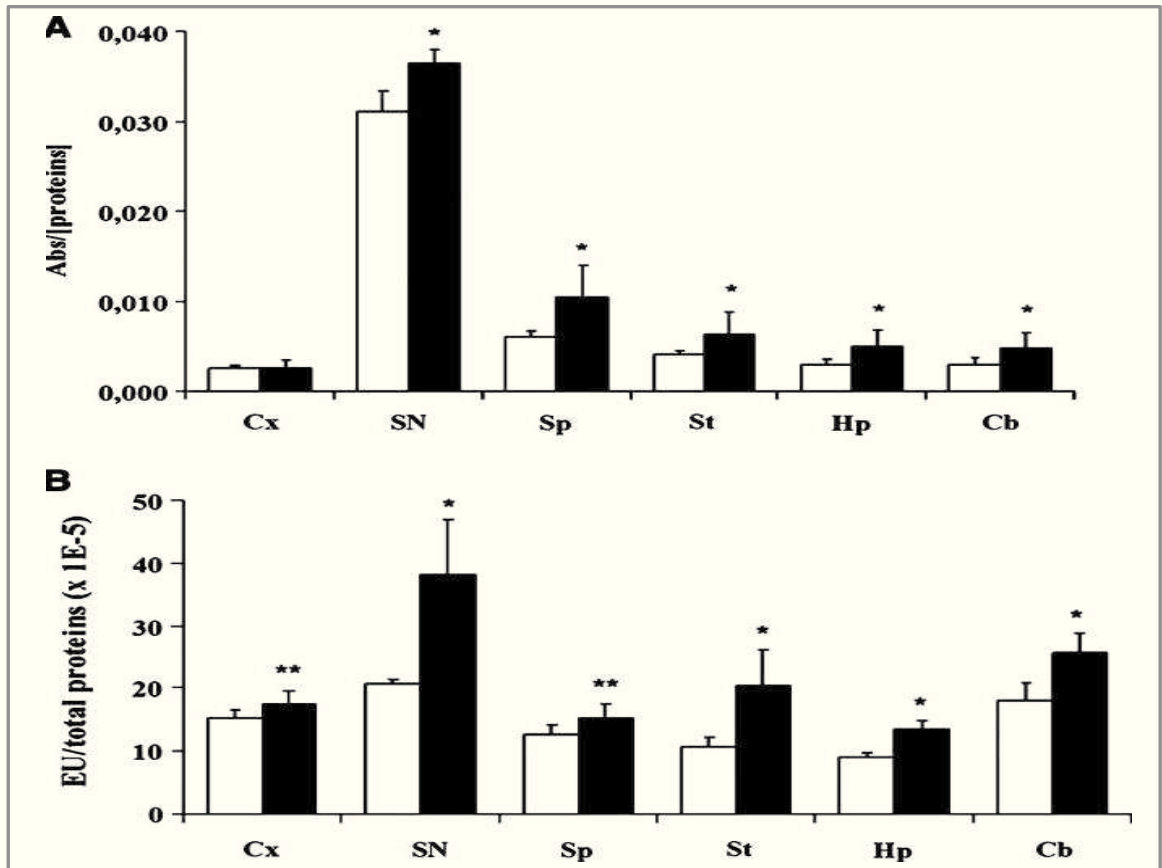
Carnosine is found in brain, heart, skin, muscles, kidneys, gut, and other tissues. It has been suggested to be potentially useful for treating Alzheimer's disease (295), autism (296), brain ischemia (297) Parkinson's disease (298), Down's syndrome (299), epilepsy (300), and aging (300). Despite the abundance of data suggesting that carnosine and related compounds have antioxidant properties and cellular protective effects, several investigators have suggested that carnosine is an endogenous neuroprotector (297), Pubill et al. (91) reported that carnosine prevents methamphetamine-induced gliosis. Gallant et al. (302) gave rats dietary carnosine and found that it reduced mortality and improved behavioural recovery of rats subjected to common carotid artery occlusion. These Results reveal that the induction of Hsp70 are reduced in SCI-operated mice treated with D-carnosine but

L-carnosine do not show these effects.

The reason of such different behaviour between L and D-carnosine in our experimental model might be ascribed to their different hydrolysis rate in vivo. Because D-carnosine is not hydrolyzed by the carnosinases, the enzymatic action in vivo would prevent L-carnosine, but not D-carnosine, from showing their protective effects after SCI.

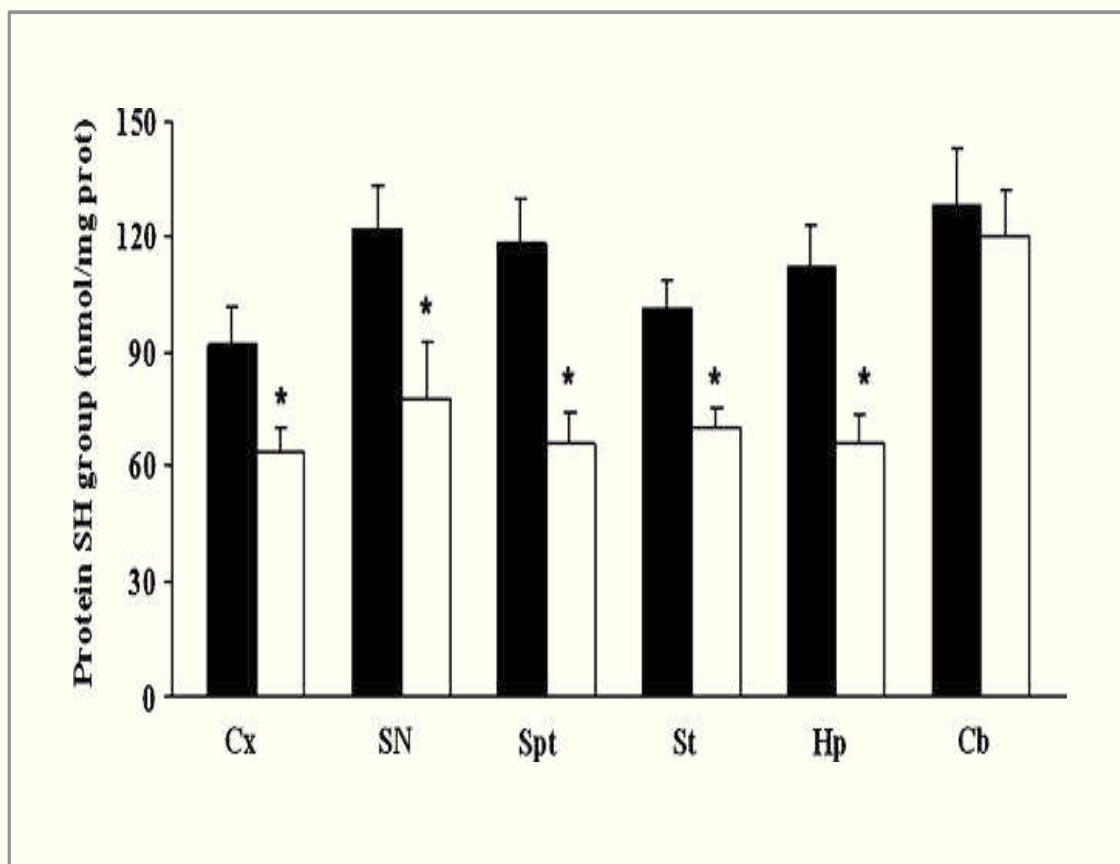
The vitagenes may therefore represent important targets for new therapeutic strategies. Modulation of cellular stress pathways and the search for neuroprotective strategies, using pharmacological interventions and food could play a key role in the treatment of neurodegenerative diseases in general.

## FIGURE



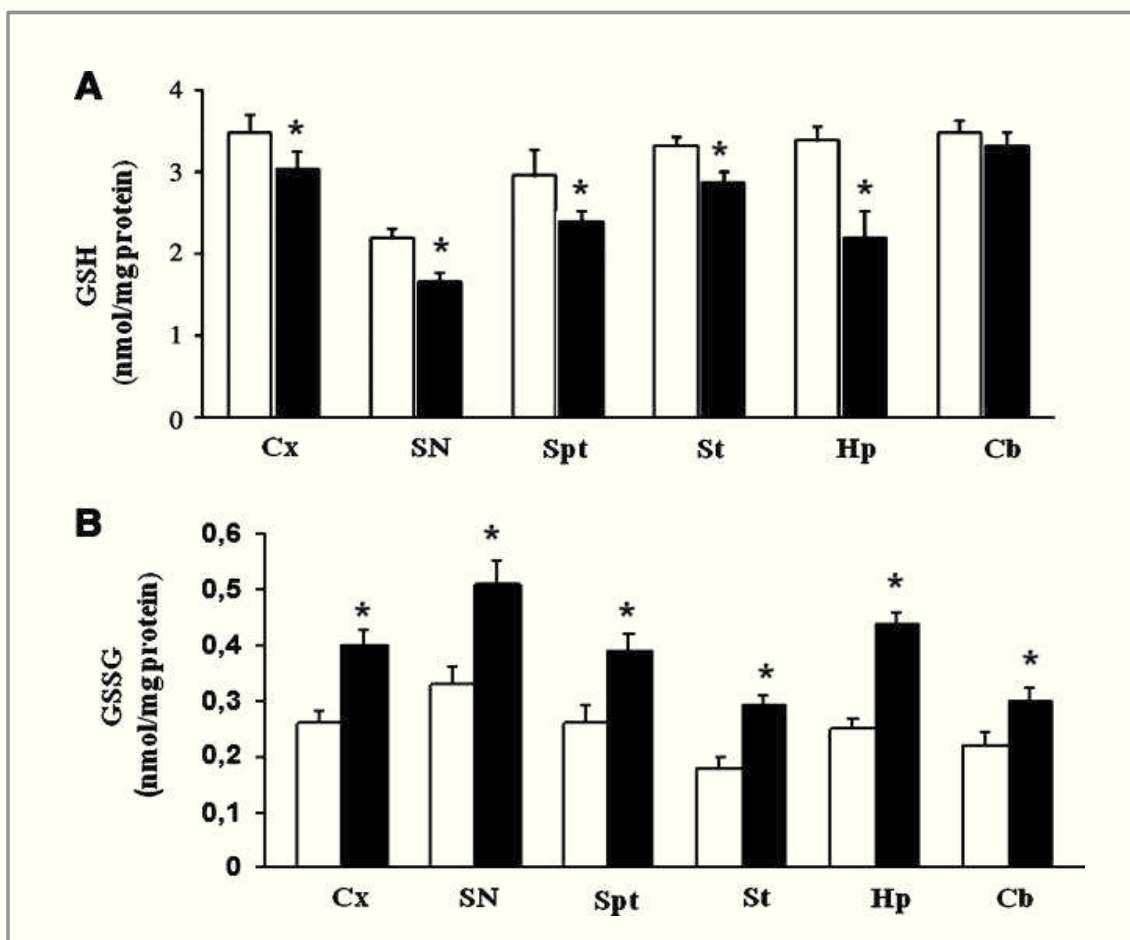
**Figura 1** Profilo di espressione (A) e attività enzimatica (B) di CN1 nelle differenti aree cerebrali. Corteccia (Cx), sostanza nera (SN), setto (Sp), striato (St), ippocampo (Hp) e cervelletto (Cb). \* $p < 0.01$  e \*\* $p < 0.05$  vs. verso i controlli. Open and solid bars represent aged and senescent, respectively.

**Figure 1** Expression profiles (A) and enzyme activity (B) of CN1 in different brain regions. Cortex (Cx), substantia nigra (SN), septum (Sp), striatum (St), hippocampus (Hp), and cerebellum (Cb). \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.05$  vs. aged control). Open and solid bars represent aged and senescent, respectively.



**Figura.2** Dosaggio dei gruppi sulfidrilici totali nelle differenti aree cerebrali di ratti senescenti e invecchiati. I gruppi totali SH nella Corteccia (Cx), nella sostanza nera (SN), nel setto (Sp), nello striato (St), nell'ippocampo (Hp) e nel cervelletto (Cb) sono stati misurati come descritto nei metodi. I risultati sono espressi in nmol/mg protein. I dati sono espressi come media SEM di otto animali \* $p < 0.05$  vs. ratti invecchiati (12-mesi).

**Figure 2** Regional distribution of total sulfhydryl groups in different brain regions of senescent and aged rats. Total SH groups in cortex (Cx), substantia nigra (SN), septum (Spt), striatum (St), hippocampus (Hp), and cerebellum (Cb) were measured, as described in Methods. Results are expressed in nmol/mg protein. Data are expressed as mean SEM of eight animals. \* $p < 0.05$  vs. aged (12-mo) rats. Solid and open bars represent aged and senescent, respectively.



**Figura.3** Dosaggio del glutathione ridotto (GSH) ed ossidato (GSSG) nelle differenti aree regionali di ratti senescenti e ratti invecchiati. Il glutathione ossidato e ridotto è stato misurato nella Corteccia (Cx), nella sostanza nera (SN), nel setto (Sp), nello striato (St), nell'ippocampo (Hp) e nel cervelletto(Cb) come descritto nei metodi. I risultati sono espressi in nmol=mg di protein. I dati sono espresso come media SEM di otto animali \* $p < 0.05$  vs. i ratti invecchiati (12-mo).

**Figure 3.** Regional distribution of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione in different brain regions of senescent and aged rats. GSH (A) and GSSG (B) in cortex (Cx), substantia nigra (SN), septum (Spt), striatum (St), hippocampus (Hp), and cerebellum (Cb) were measured as described in Methods. Results are expressed in nmol=mg protein. Data are expressed as mean SEM of eight animals. \* $p < 0.05$  vs. aged (12-mo) rats. Open and solid bars represent aged and senescent, respectively.

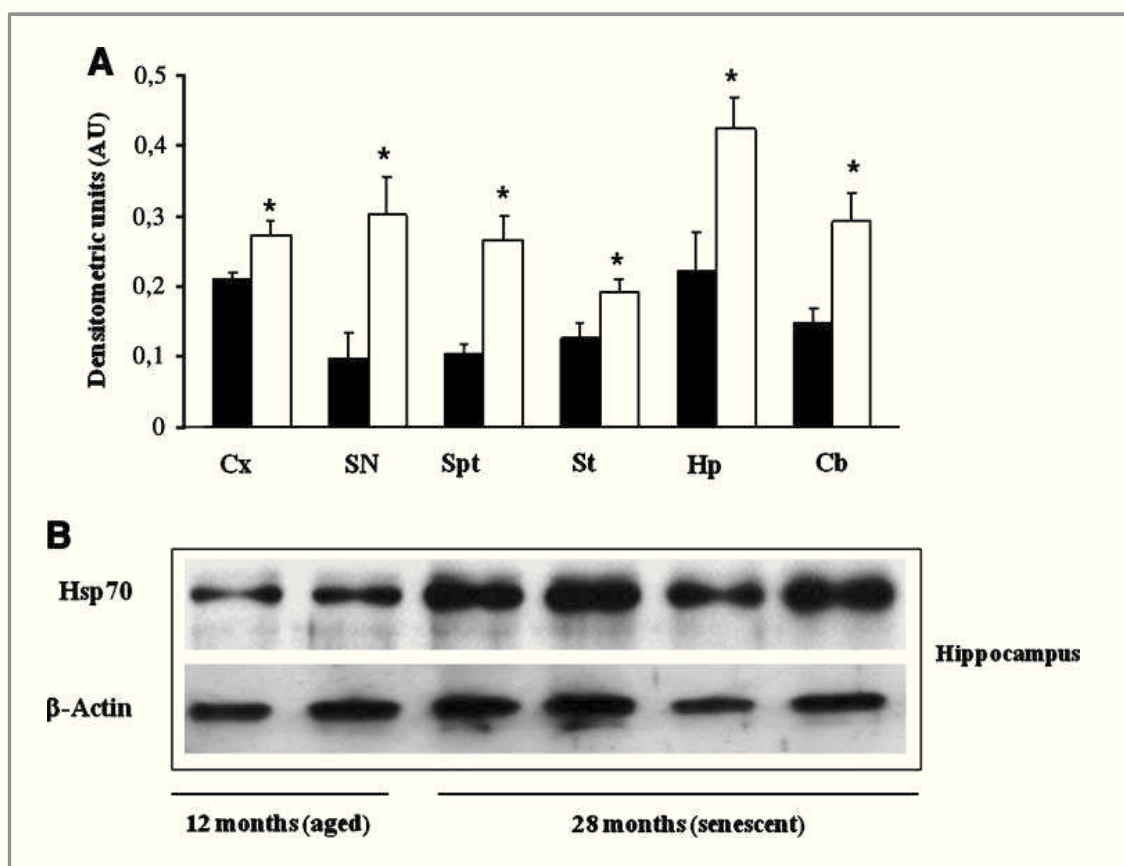
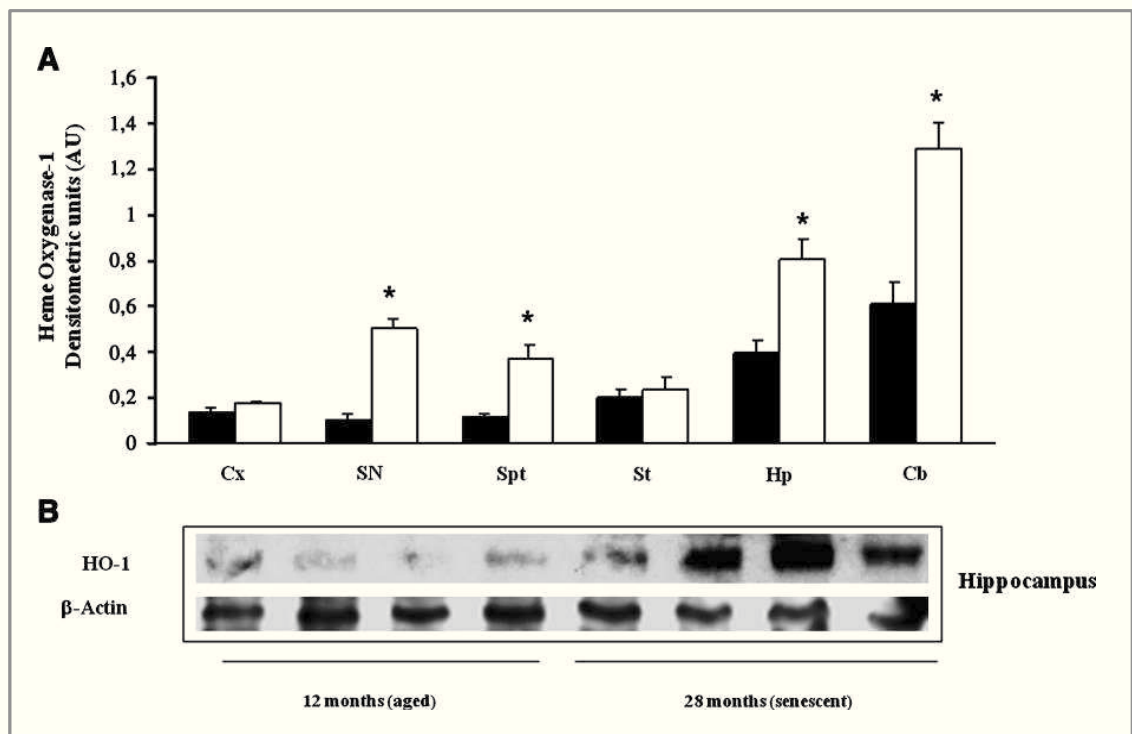


Figura. 4 **Analisi Western blot.** Livelli di espressione di Hsp-72 nelle differenti aree cerebrali in ratti senescenti ed invecchiati. I livelli di espressione dell'Hsp-72 sono stati misurati, , nella Corteccia (Cx), nella sostanza nera (SN), nel setto (Sp), nello striato (St), nell'ippocampo (Hp) e nel cervelletto(Cb), mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di otto animali.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; CTRL, controlli; St, standard.

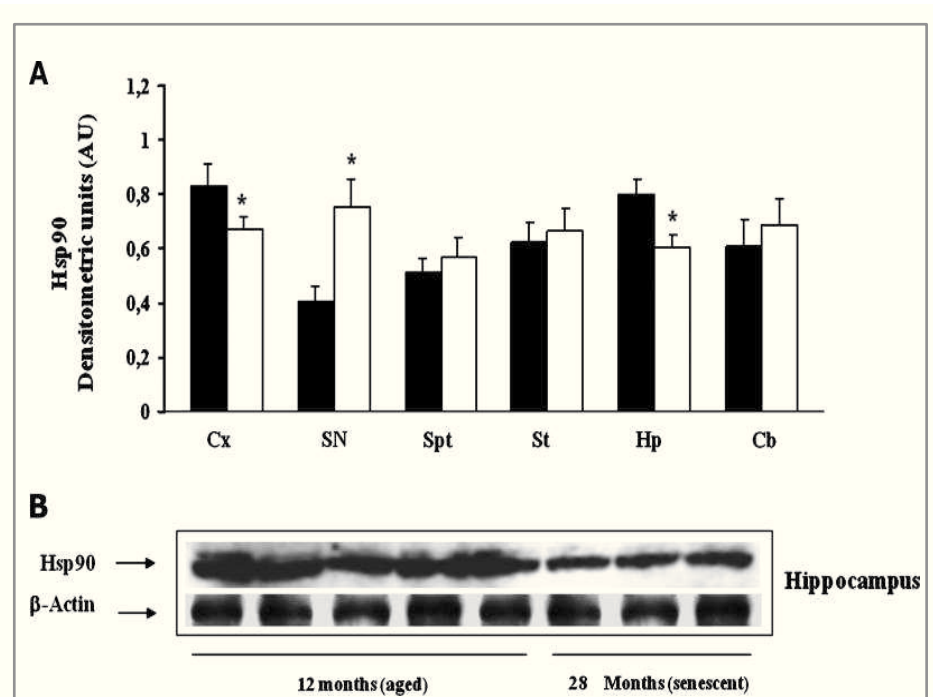
**Figure 4 Western blot assay.**Regional distribution in the levels of Hsp72 immunoreactive material in different brain regions of aged and senescent rats. Hsp72 from cortex, substantia nigra, septum, striatum, hippocampus, and cerebellum samples, in aged and senescent rats, were analyzed as described in Methods. (A) Values are expressed as densitometric units obtained by scanning the Western blot luminographs with a laser densitometer. (B) Representative Western blots of samples from hippocampus. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of eight animals. Cortex (Cx), substantia nigra (SN),

septum (Spt), striatum (St), hippocampus (Hp), and cerebellum (Cb). \* $p < 0.05$  vs. aged rats. Solid and open bars represent aged and senescent, respectively.



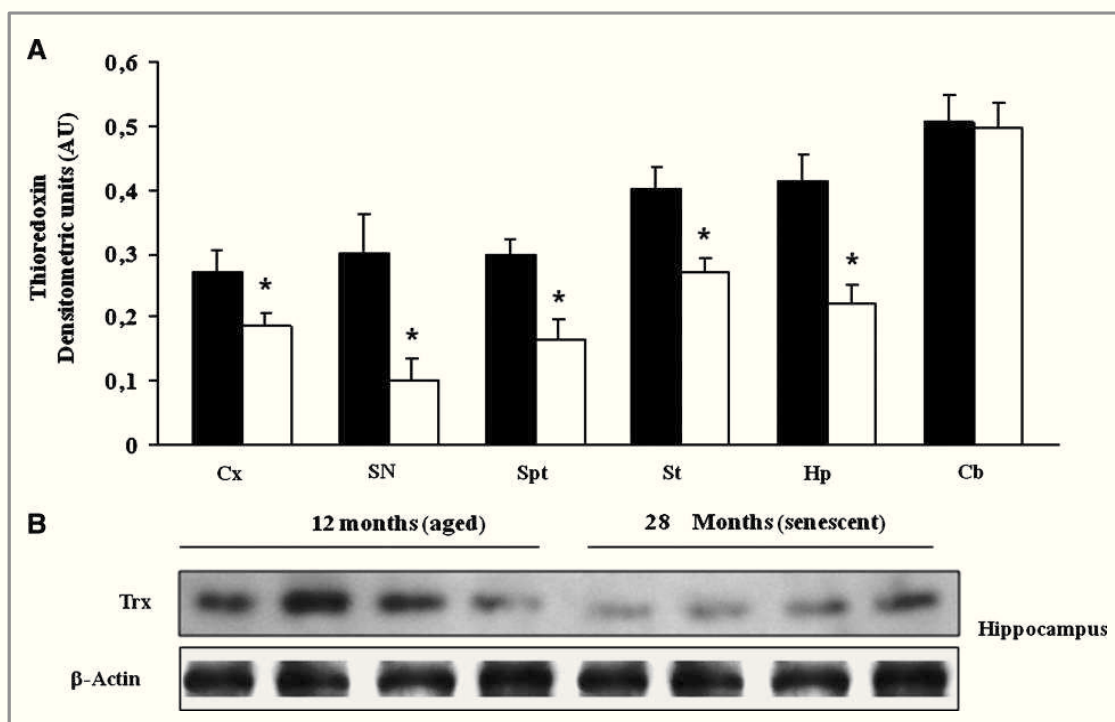
**Figura.5. Analisi Western blot** Livelli di espressione di HO-1 nelle differenti aree cerebrali in ratti senescenti ed invecchiati. I livelli di espressione dell'HO-1 sono stati misurati, , nella Corteccia (Cx), nella sostanza nera (SN), nel setto (Sp), nello striato (St), nell'ippocampo (Hp) e nel cervelletto(Cb), mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di otto animali.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; CTRL, controlli; St, standard.

**Figure 5 Western blot assay.** Regional distribution in the levels of HO-1 immunoreactivity in different brain regions of aged and senescent rats. HO-1 from cortex (Cx), substantia nigra (SN), septum (Spt), striatum (St), hippocampus (Hp), and cerebellum (Cb) samples, in aged and senescent rats, were analyzed as described in Methods. (A) Values are expressed as densitometric units obtained by scanning the Western-blot luminographs with a laser densitometer. (B) Representative Western blots of samples from the hippocampus. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of eight animals. \* $p < 0.05$  vs. aged rats. Solid and open bars represent aged and senescent, respectively.



**Figura 6 . Analisi Western blot** Livelli di espressione di Hsp-90 nelle differenti aree cerebrali in ratti senescenti ed invecchiati. I livelli di espressione dell'Hsp-90 sono stati misurati, , nella Corteccia (Cx), nella sostanza nera (SN), nel setto (Sp), nello striato (St), nell'ippocampo (Hp) e nel cervelletto(Cb), mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di otto animali.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; CTRL, controlli; St, standard.

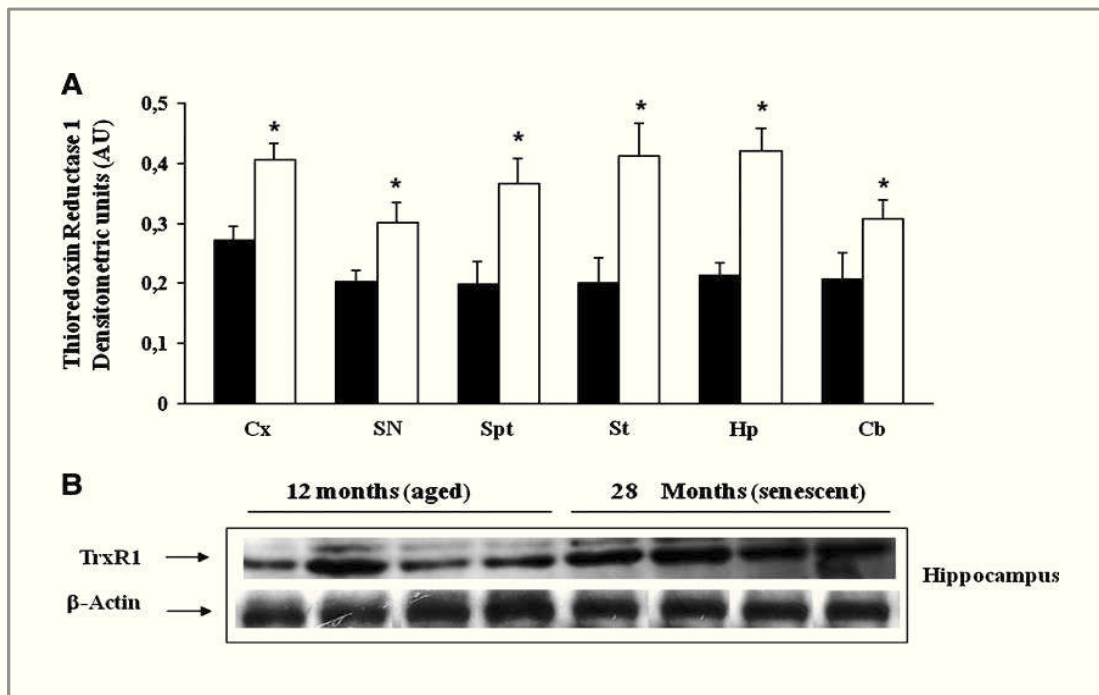
**Figure 6 Western blot assay.** Expression of Hsp90 in different brain regions of aged and senescent rats. (A) Regional Hsp90 protein distribution was estimated as described in Methods. (B) Representative Western blots of samples from hippocampus. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of eight animals. Cortex (Cx), substantia nigra (SN), septum (Spt), striatum (St), hippocampus (Hp), and cerebellum (Cb). \* $p < 0.05$  vs. aged rats. Solid and open bars represent aged and senescent, respectively.



**Figura.7 Analisi Western blot** . Livelli di espressione di Trx nelle differenti aree cerebrali in ratti senescenti ed invecchiati. I livelli di espressione della Trx sono stati misurati, , nella Corteccia (Cx), nella sostanza nera (SN), nel setto (Sp), nello striato (St), nell'ippocampo (Hp) e nel cervelletto(Cb), mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di otto animali.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; CTRL, controlli; St, standard.

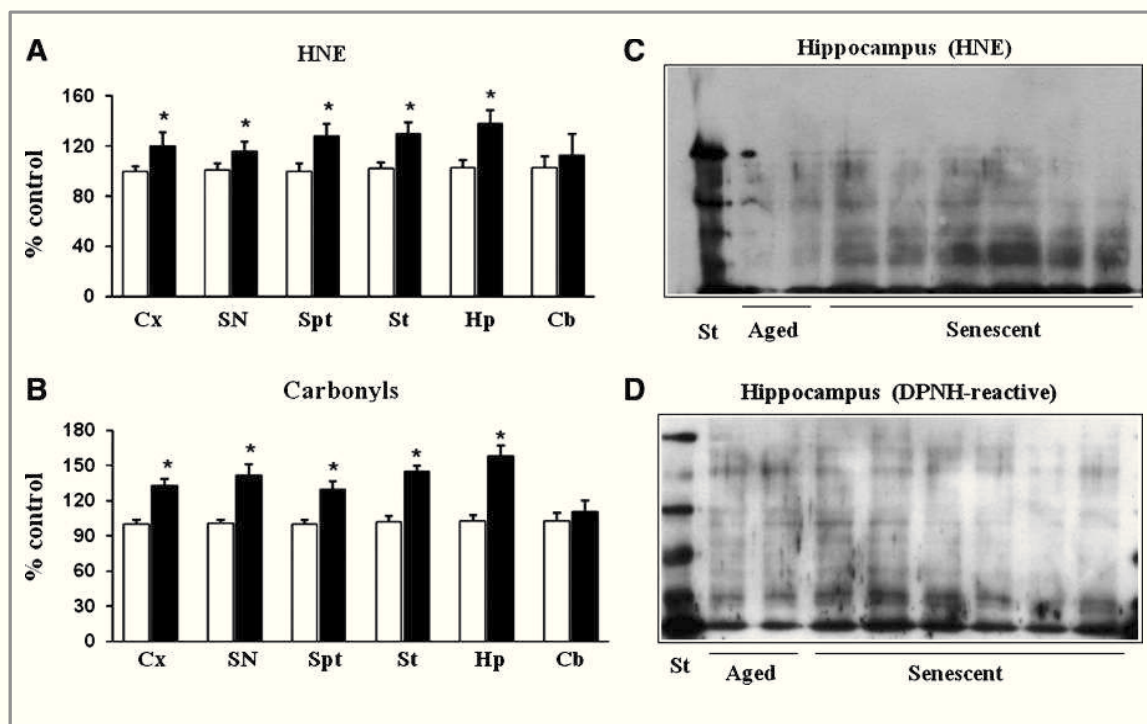
**Figure 7 Western blot assay.** Thioredoxin (TRX) expression in different brain regions of aged and senescent rats. (A) Regional distribution of TRX protein was estimated as described in Methods. (B) representative Western blots of samples from hippocampus. Data are expressed as mean SEM of eight animals. Cortex (Cx), substantia nigra (SN), septum (Spt), striatum (St), hippocampus (Hp), and cerebellum (Cb). \* $p < 0.05$  vs. aged rats. Solid and open bars represent aged and senescent, respectively.





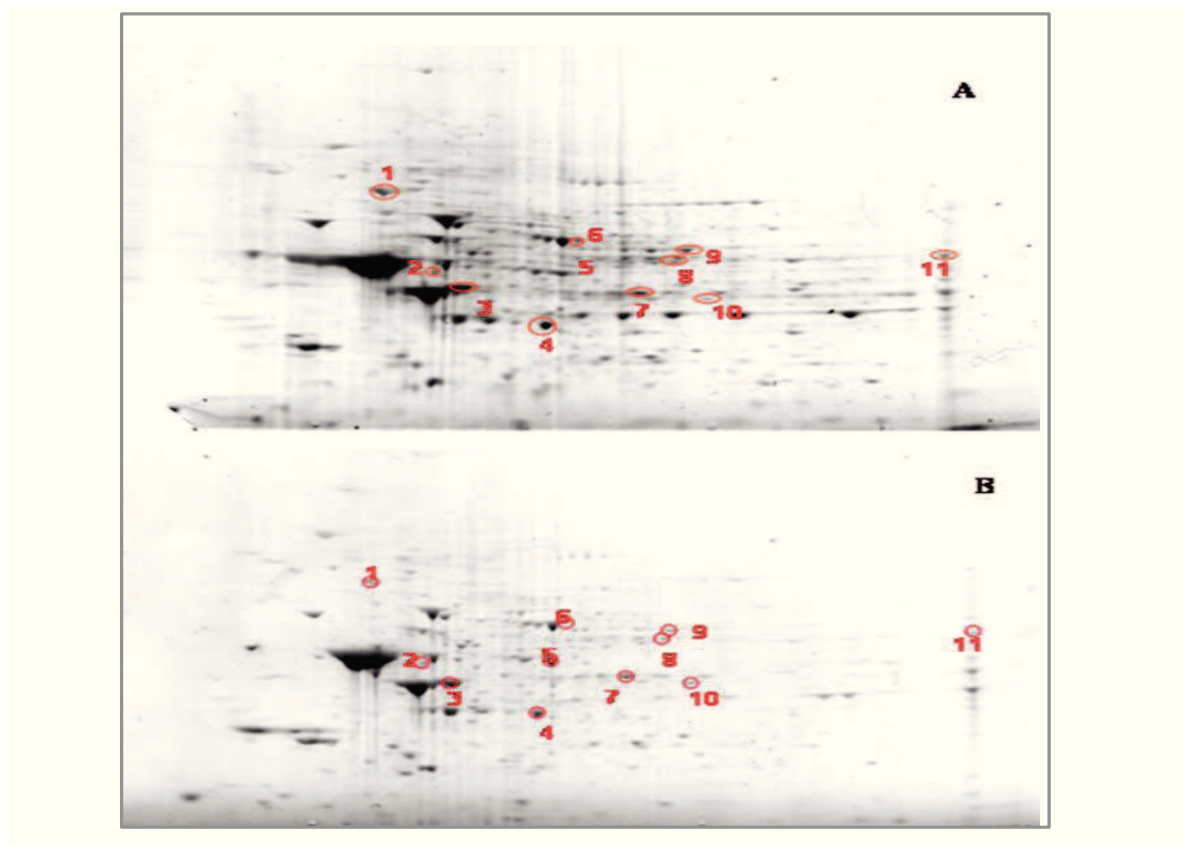
**Figura.8. Analisi Western blot** Livelli di espressione di TrxR nelle differenti aree cerebrali in ratti senescenti ed invecchiati. I livelli di espressione dell'TrxR sono stati misurati, , nella Corteccia (Cx), nella sostanza nera (SN), nel setto (Sp), nello striato (St), nell'ippocampo (Hp) e nel cervelletto(Cb), mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di otto animali.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; CTRL, controlli; St, standard.

**Figure 8 Western blot assay.** Thioredoxin reductase expression in different brain regions of aged and senescent rats. (A) Thioredoxin reductase protein was estimated as described in Methods. (B) Representative Western blots of samples from hippocampus. Data are expressed as mean<sub>SEM</sub> of eight animals.  $*p < 0.05$  vs. aged rats. Cortex (Cx), substantia nigra (SN), septum (Spt), striatum (St), hippocampus (Hp), and cerebellum (Cb).  $*p < 0.05$  vs. aged rats. Solid and open bars represent aged and senescent, respectively.



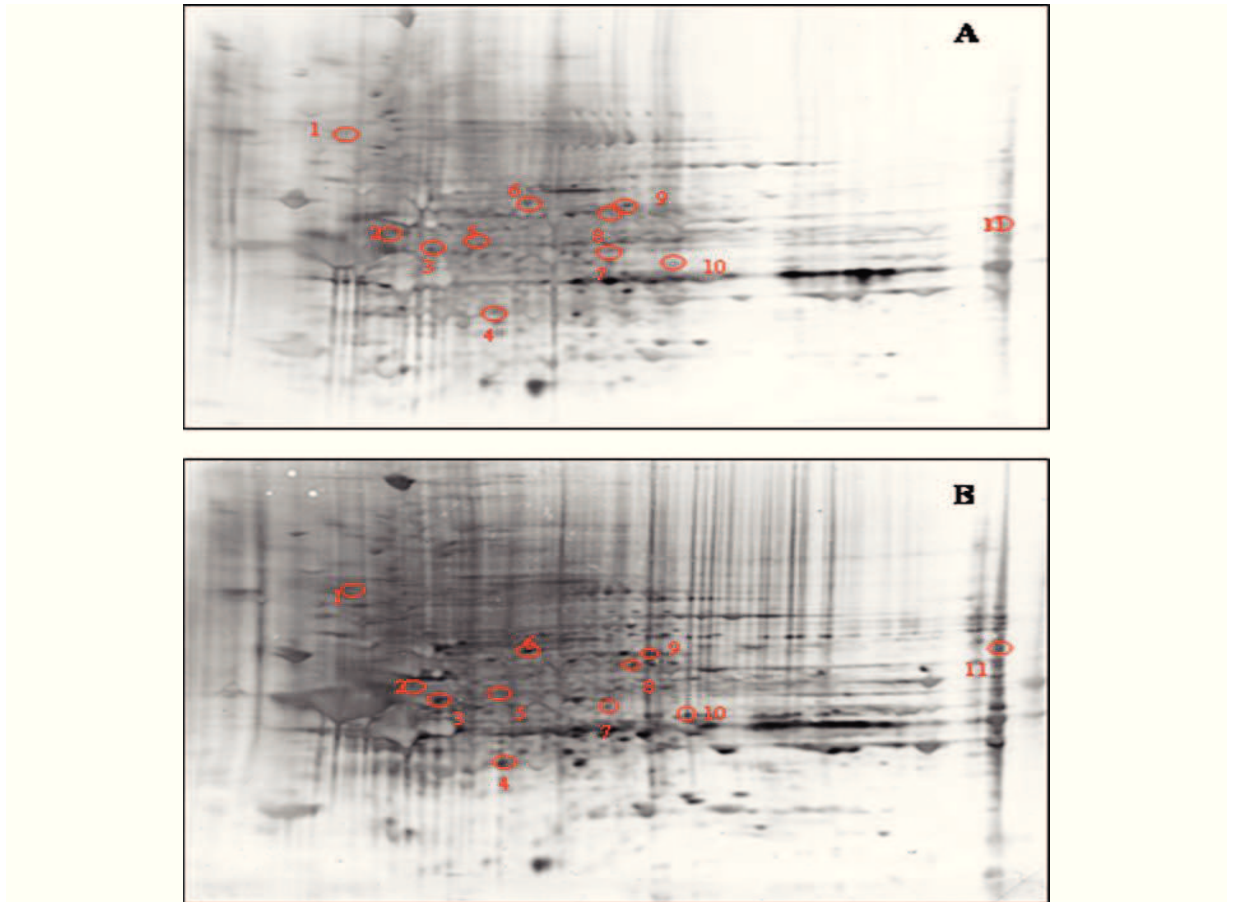
**Figura.9. Analisi Western blot.** Livelli di espressione dell'HNE (A) e dei gruppi carbonili (B) nelle differenti aree cerebrali in ratti senescenti ed invecchiati. I livelli di espressione dell'HNE e dei gruppi carbonili sono stati misurati, , nella Corteccia (Cx), nella sostanza nera (SN), nel setto (Sp), nello striato (St), nell'ippocampo (Hp) e nel cervelletto(Cb), mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di otto animali.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; CTRL, controlli; St, standard.

**Figure 9 Western blot assay.** Examination of HNE (A) and carbonyl (B) levels in different brain regions in aged and senescent rats. Cortex (Cx), substantia nigra (SN), septum (Spt), striatum (St), hippocampus (Hp), and cerebellum (Cb). Representative Western blot analysis of HNE (C) and protein carbonyls (D) of samples from hippocampus. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of eight animals.  $*p < 0.05$  vs. aged rats. Open and solid bars represent aged and senescent, respectively.



**Figure 10** Gel 2D rappresentativo di ippocampo di ratti senescenti ed invecchiati.

**Figure 10.** Representative 2-D gels of aged (A) and senescent (B) rat hippocampus. Proteins (150  $\mu$ g) were separated on immobilized pH 3–10 IPG strips followed by separation on 8–16% gradient SDS-PAGE gels and stained with Biosafe Coomassie.



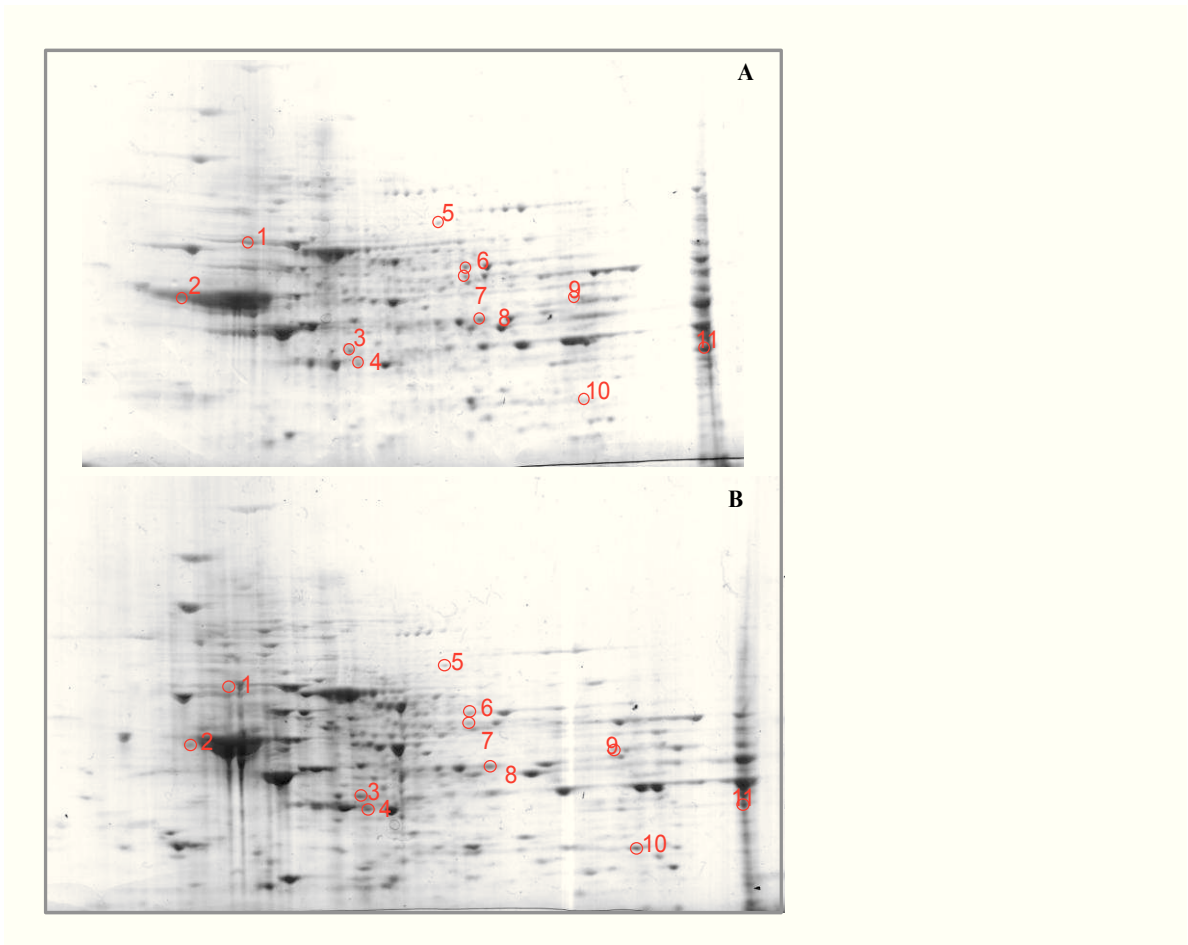
**Figure 11** Immunoblot 2D di carbonili di ippocampo di ratti senescenti ed invecchiati

**Figura.11.** Two-dimensional carbonyl immunoblots from aged (A) and senescent (B) rat hippocampus. Relative change in carbonyl immunoreactivity, after normalization of the immunostaining intensities to the protein content, was significant for six proteins..

Spot n°	N° spot	Protein name	P value	Fold oxidation	Score	AC <sup>(a)</sup>	Mw/pI	Sequence Coverage %
1	1607	Heat shock protein HSP 90-beta	<0.05	5.3	169	P34058	83571/4.97	32
2	2208	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial precursor	<0.01	10.8	139	Q68FY0	53500/5.57	20
3	3206	Creatine kinase B-type	<0.05	5	181	P07335	42983/5.39	41
4	5107	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	<0.04	9.4	144	O88989	36631/6.16	32
5	5306	Alpha-enolase	<0.01	3.9	109	P04764	47440/6.16	17
6	6504	Dihydropyrimidinase-related protein 2	<0.05	6	125	P47942	62638/5.95	20
7	7206	Glutamine synthetase	<0.05	6.4	91	P09606	42982/6.64	20
8	7404	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial precursor	<0.05	16.6	133	P26443	61640/8.05	25
9	7411	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	<0.05	5.9	227	P11980	58294/6.63	40
10	7209	Fructose-bisphosphate aldolase C	<0.01	10.3	109	P09117	39658/6.67	24
11	9401	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	<0.04	9	232	P15999	59831/9.22	29

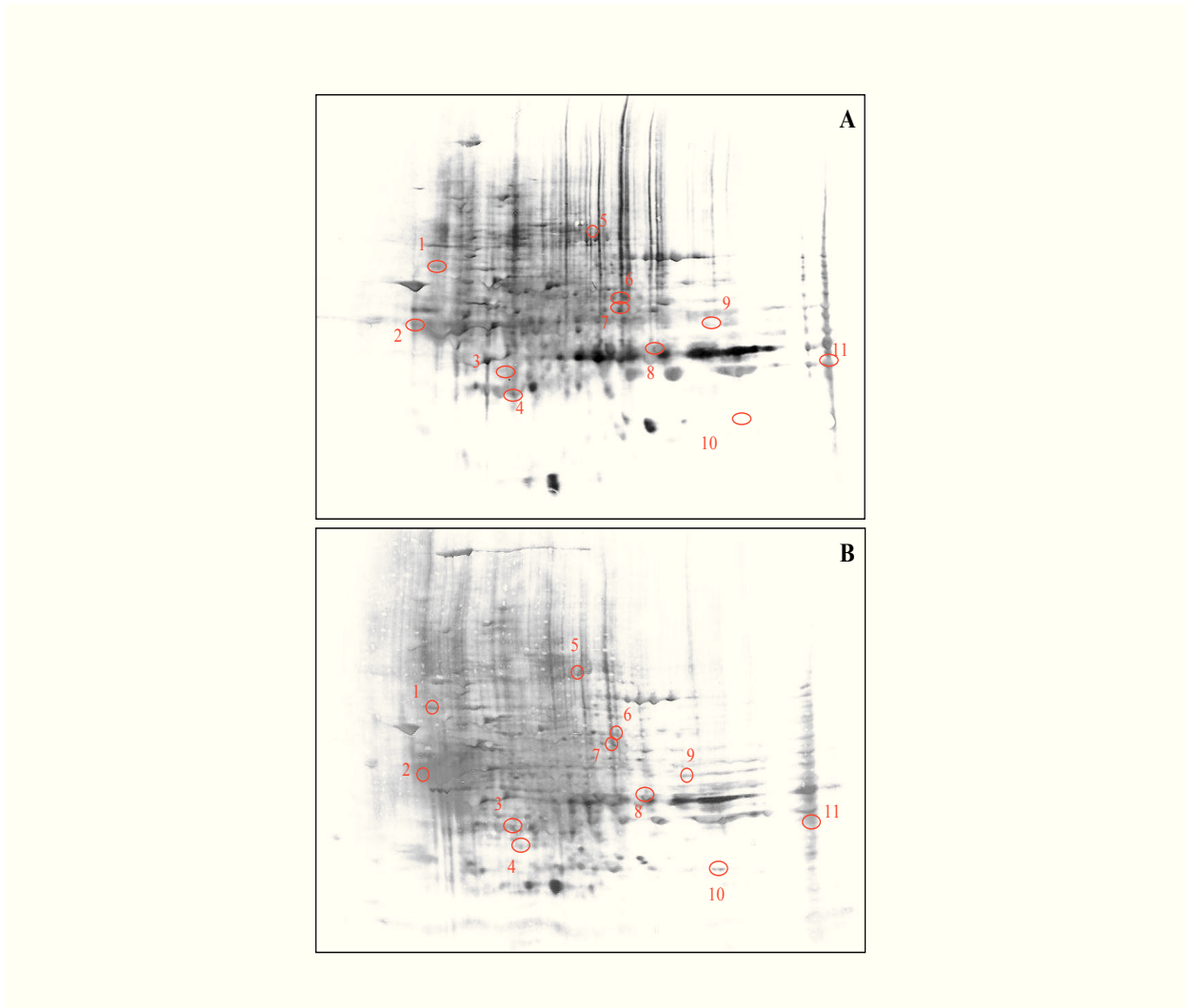
**Tabella 1** Riepilogo delle proteine carbonilate identificate mediante Redox Proteomica nell'ippocampo di ratti senescenti rispetto a ratti invecchiati.

**Table 1** Summary of the Proteins Identified by Redox Proteomics that are Increasingly Carbonylated in the Hippocampus from Senescent Rats vs Aged Rats



**Figura 12** Gel 2D rappresentativo di cervelletto di ratti invecchiati e senescenti.

**Figure 12** Representative 2-D gels of aged (A) and senescent (B) rat cerebellum. Proteins (150 lg) were separated on immobilized pH 3–10 IPG strips followed by separation on 8–16% gradient SDS-PAGE gels and stained with Biosafe Coomassie.



**Figura 13** Immunoblot 2D carbonili di cervelletto di ratti invecchiati e senescenti.

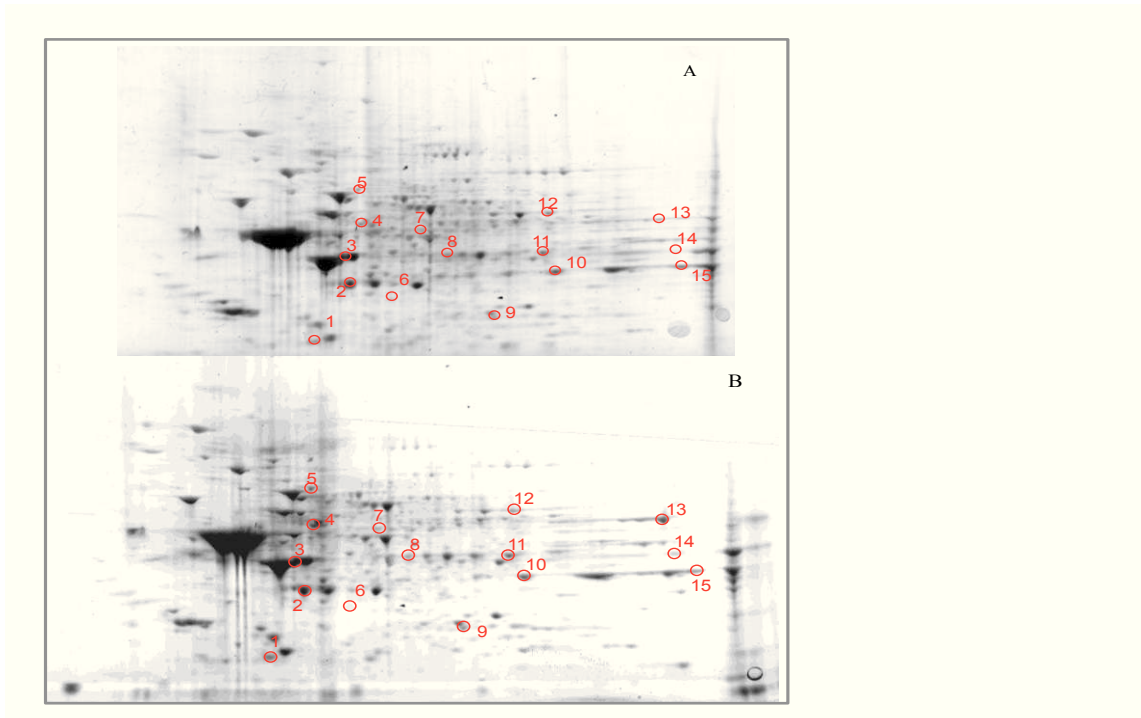
**Figure.13.** Two-dimensional carbonyl immunoblots from aged (A) and senescent (B) rat cerebellum. Relative change in carbonyl immunoreactivity, after normalization of the immunostaining intensities to the protein content, was significant for six proteins.

Spot n°	Protein name	P value	oxidation	Score	Theoretical mw/pI
1	Heat shock cognate 71 kDa protein	<0.05	7.1	83	71244/5.37
2	Tubulin beta chain	<0.05	3.2	99	46994/4.78
3	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	<0.05	2.8	75	36659/6.16
4	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondria	<0.05	4.1	86	40044/5.94
5	Vesicle-fusing ATPase	<0.05	3.4	132	83170/6.55
6	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	<0.05	4.4	114	58294/6.63
7	Synapsin-2	<0.05	2.8	75	63702/8.73
8	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	<0.05	5.2	131	46628/6.73
9	Phosphoglycerate kinase 1	<0.05	3.8	95	44909/8.02
10	Voltage-dependent anion-selective channel protein	<0.05	2.7	168	30851/8.62
11	Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial	<0.05	4.2	137	25301/7.79

**Tabella 2.** Riepilogo delle proteine carbonilate identificate mediante Redox Proteomica in cervelletto di ratti senescenti rispetto a ratti invecchiati.

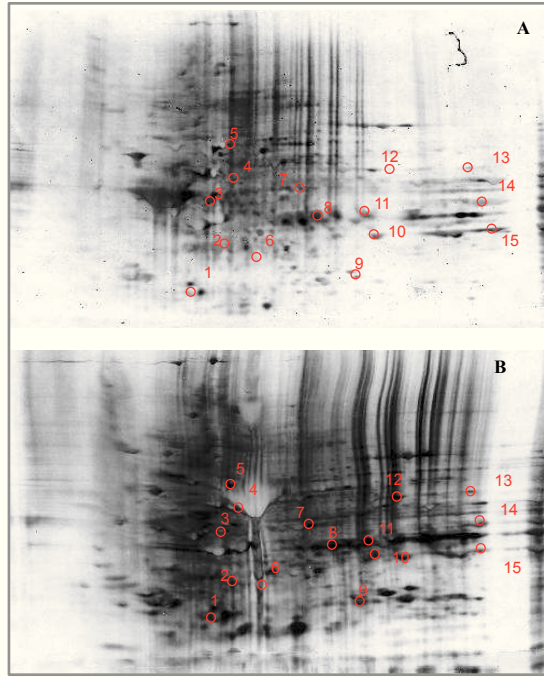
**Table 2** Summary of the Proteins Identified by Redox Proteomics That Are Increasingly Carbonylated in the Cerebellum From Senescent vs. Aged Rats





**Figura 14** Gel 2D rappresentativo di corteccia di ratti invecchiati e senescenti.

**Figure. 14** Representative 2-D gels of aged (A) and senescent (B) rat cortex. Proteins (150 lg) were separated on immobilized pH 3–10 IPG strips followed by separation on 8–16% gradient SDS-PAGE gels and stained with Biosafe Coomassie.



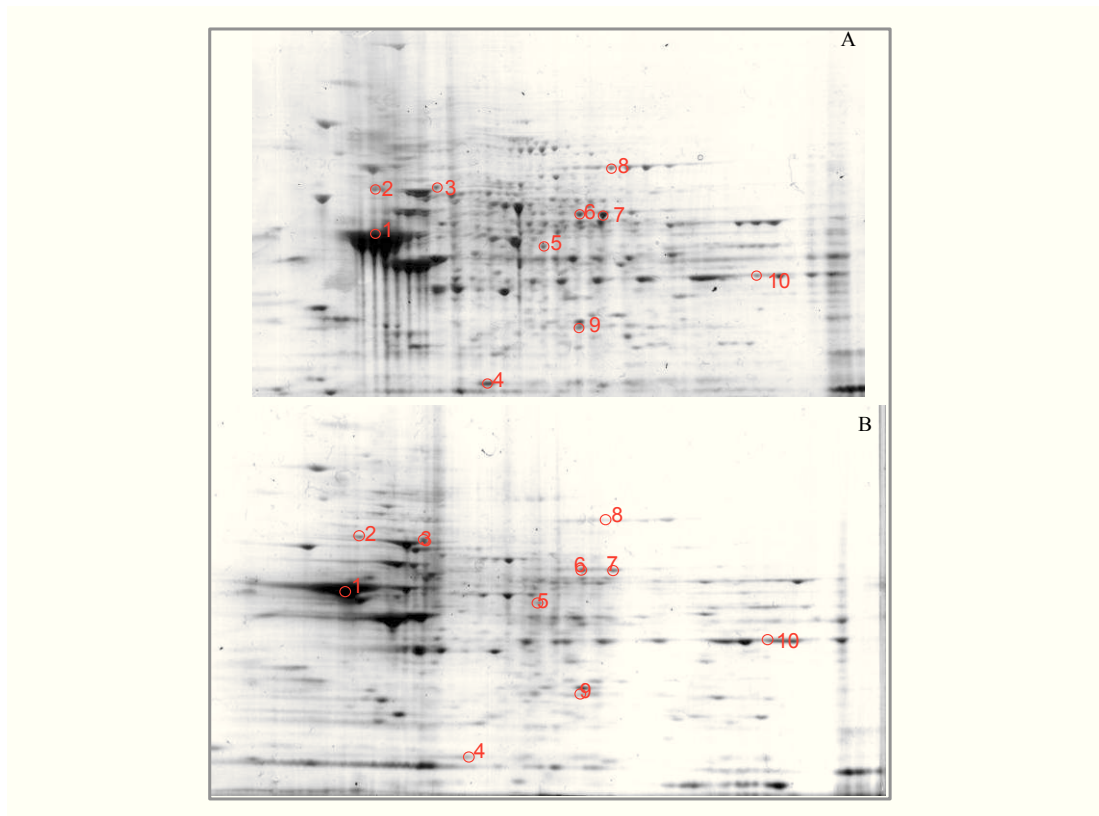
**Figura 15** Immunoblot 2D di carbonili di corteccia di ratti invecchiati e senescenti.

**Figure.15.** Two-dimensional carbonyl immunoblots from aged (A) and senescent (B) rat cortex. Relative change in carbonyl immunoreactivity, after normalization of the immunostaining intensities to the protein content, was significant for six proteins.

Spot n°	Protein name	fold	P value	Score	Mw/pI
1	Peroxiredoxin-2	10.1	0.016	91	21941/ 5.34
2	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-1	2.2	0.018	161	38151/ 5.60
3	Creatine kinase B-type	10.0	0.005	72	42052/ 5.39
4	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	5.9	0.005	214	56857/ 5.95
5	Stress-70 protein, mitochondrial precursor	3.5	0.047	208	74094/ 5.37
6	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	4.1	0.004	86	59291/ 5.58
7	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	29.0	0.008	192	56966/ 6.63
8	Alpha-actinin	2.66	0.019	117	42701/ 6.19
9	Triosephosphate isomerase	4.8	0.018	161	27345/ 6.89
10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7.4	0.024	82	36090/ 8.97
11	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	3.4	0.018	239	46628/ 6.73
12	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2.8	0.047	175	58294/ 6.63
13	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	5.1	0.042	205	59831/ 9.22
14	Fructose-bisphosphate aldolase A	4.7	0.044	188	39783/ 8.31
15	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	34.8	0.015	146	36090/8.14

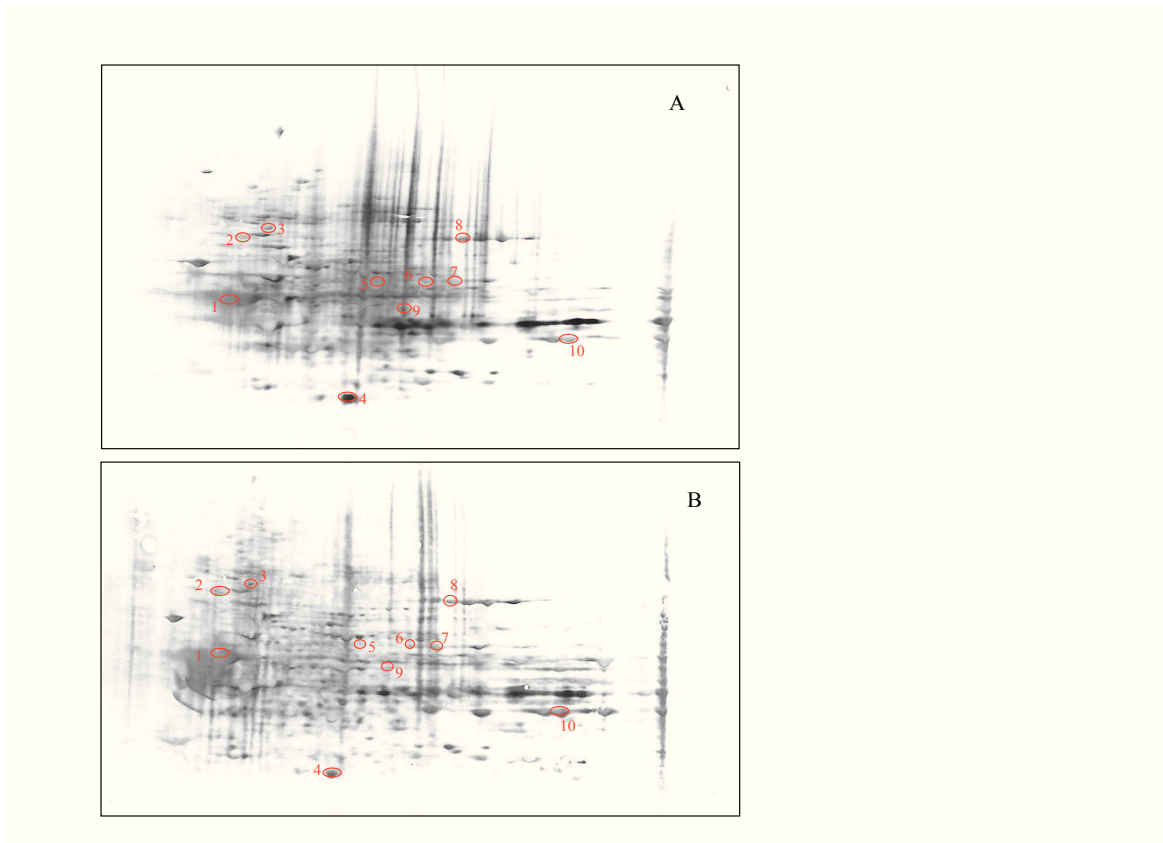
**Tabella 3** Riepilogo delle proteine carbonilate identificate mediante Redox Proteomica nella corteccia di ratti senescenti rispetto a ratti invecchiati.

**Table 3.** Summary of the Proteins Identified by Redox Proteomics that Are Increasingly Carbonylated in the Cortex from Senescent Versus Aged Rats



**Figura 16** Gel 2D rappresentativo dello striato di ratti senescenti ed invecchiati.

**Figure. 16** Representative 2-D gels of aged (A) and senescent (B) rat striatum. Proteins (150 lg) were separated on immobilized pH 3–10 IPG strips followed by separation on 8–16% gradient SDS-PAGE gels and stained with Biosafe Coomassie.



**Figura 17** Immunoblot 2D di carbonili dello striato di ratti senescenti ed invecchiati.

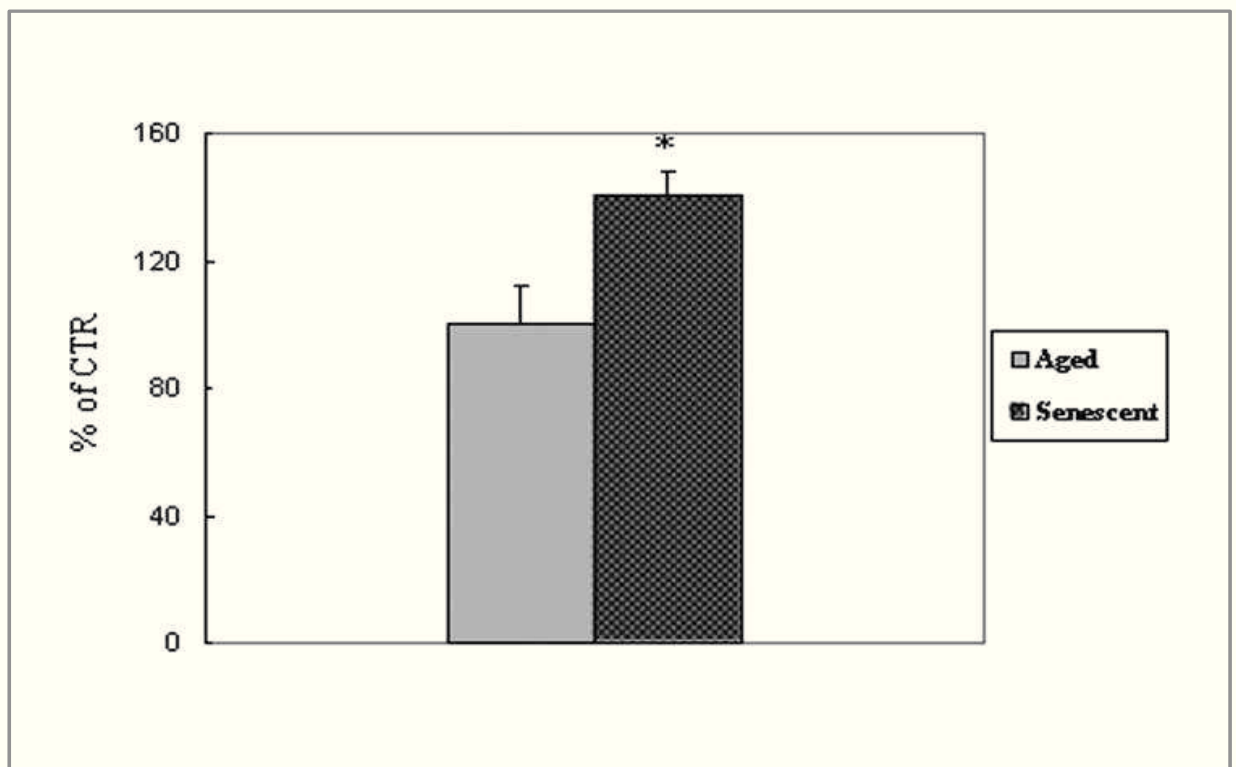
**Figure17.** Two-dimensional carbonyl immunoblots from aged (A) and senescent (B) rat striatum. Relative change in carbonyl immunoreactivity, after normalization of the immunostaining intensities to the protein content, was significant for six proteins.

Spot n°	Protein name	P value	oxidation	Score	Theoretical mw/pI
1	Tubulin alpha-1A chain	<0.05	2.9	260	50788/4.94
2	78 kDa glucose-regulated protein	<0.05	3.8	146	72473/5.07
3	Stress-70 protein, mitochondria	<0.05	3.1	179	74097/5.37
4	Adenylate kinase isoenzyme	<0.05	3.0	94	21684/6.32
5	Elongation factor Tu, mitochondrial	<0.05	4.5	184	49890/7.23
6	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	<0.05	10.6	71	49890/7.23
7	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	<0.05	4.3	194	58294/6.63
8	Aconitate hydratase, mitochondrial	<0.05	3.3	240	86121/7.87
9	Triosephosphate isomerase	<0.05	4.0	97	27346/6.67
10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<0.05	9.9	151	36090/8.14

**Tabella 4** Riepilogo delle proteine carbonilate identificate mediante Redox Proteomica nello striato di ratti senescenti rispetto a ratti invecchiati.

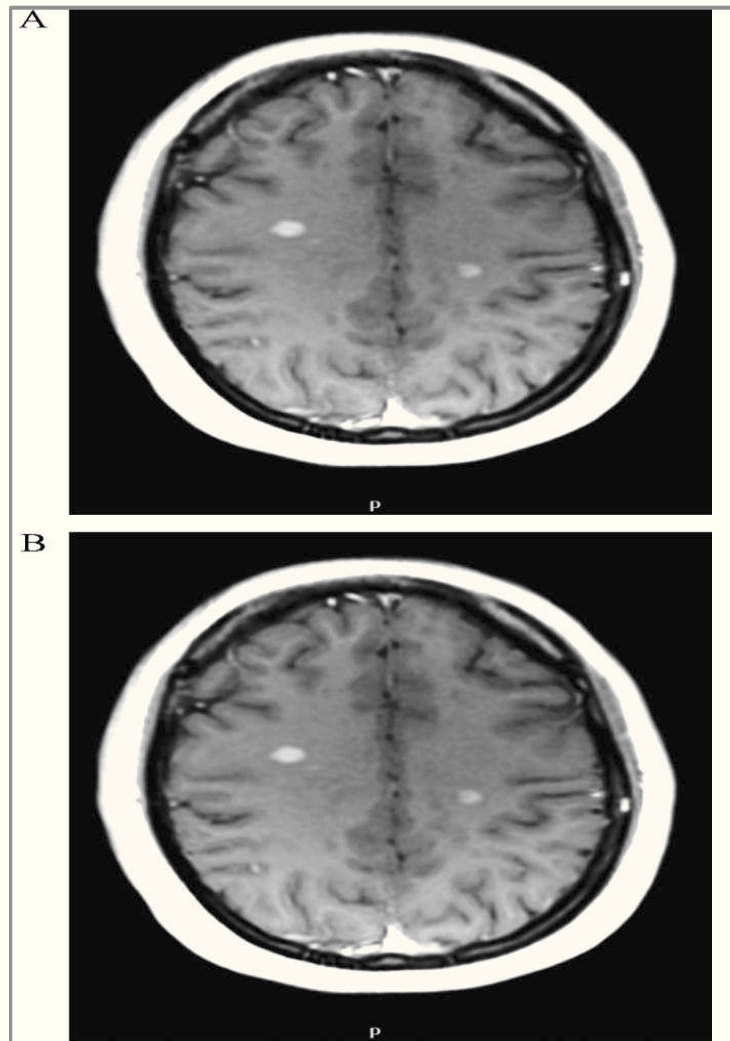
**Table 4.** Summary of the Proteins Identified by Redox Proteomics That Are Increasingly Carbonylated in the Striatum From Senescent vs. Aged Rats

y



**Figura 18 Analisi Western blot** per confermare i dati di proteomica riguardo i livelli di Hsp-70 carbonilati nell'ippocampo di ratti invecchiati comparati a ratti senescent utilizzando un tradizionale detenzione immunochimica. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti in ciascun gruppo. \*P < 0.05.

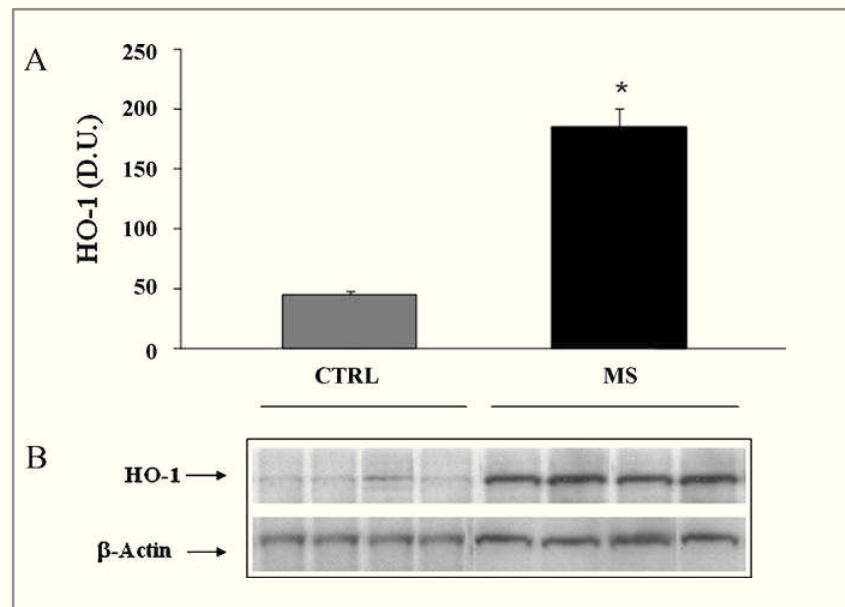
**Figure 18. Western blot analysis** confirmed proteomic results of increased carbonyl levels of Hsp70 in senescent rat hippocampus compared with aged rat using traditional immunochemical detection. Error bars indicate SEM for three samples in each group. \*P < 0.05.



**Figura 19** RM cerebrale di pazienti con sclerosi multipla: assiale T1WI mostra mostrano due aree ipointense sulla materia bianca del centro semiovale bilateralmente (A) che presentano aumento dopo iniezione di gadolinio

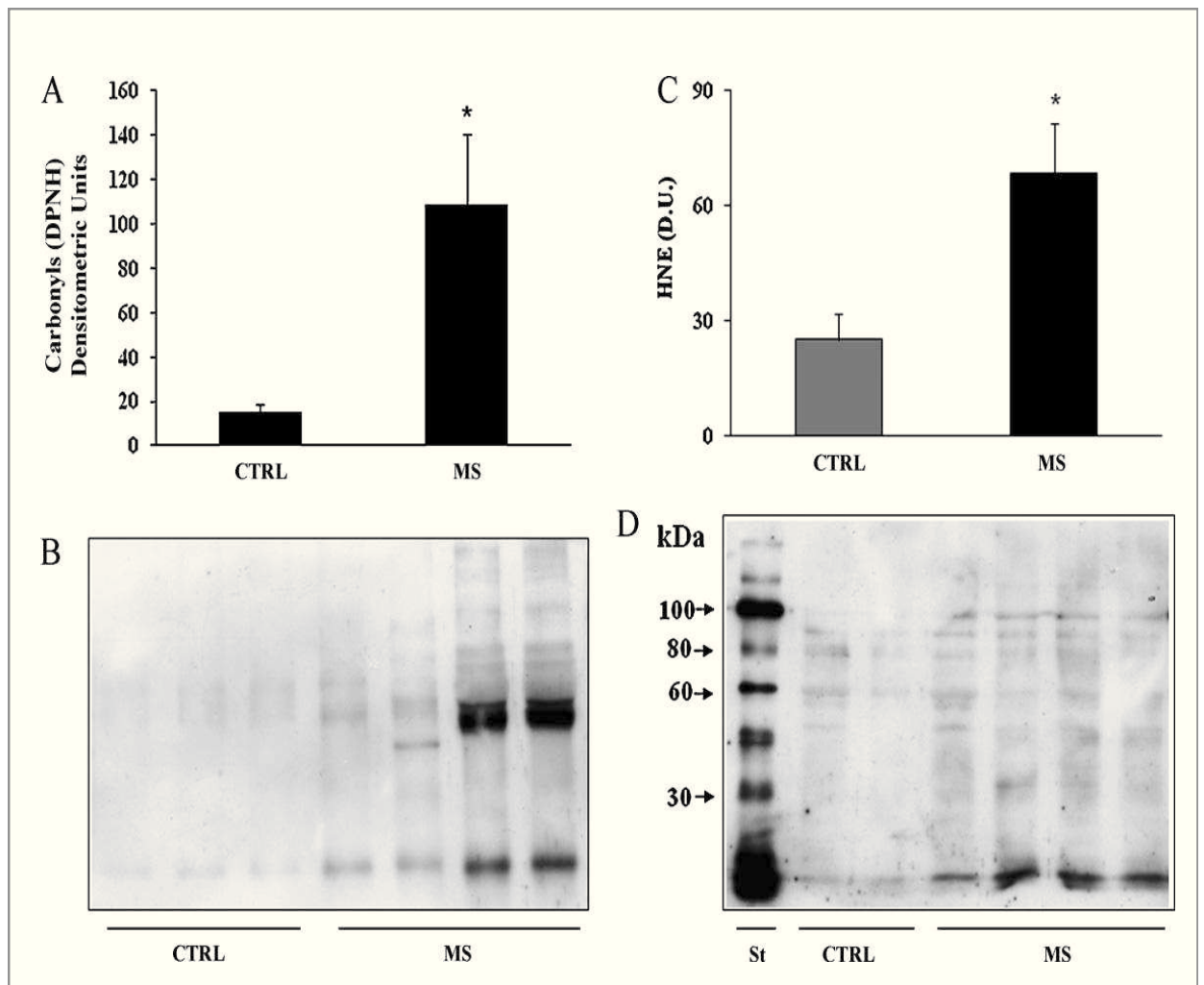
**Figure 19.** Brain MRI from MS patients: axial T1WI shows two hypointense areas on the white matter of the semioval center bilaterally (A) that present enhancement after gadolinium injection (B).





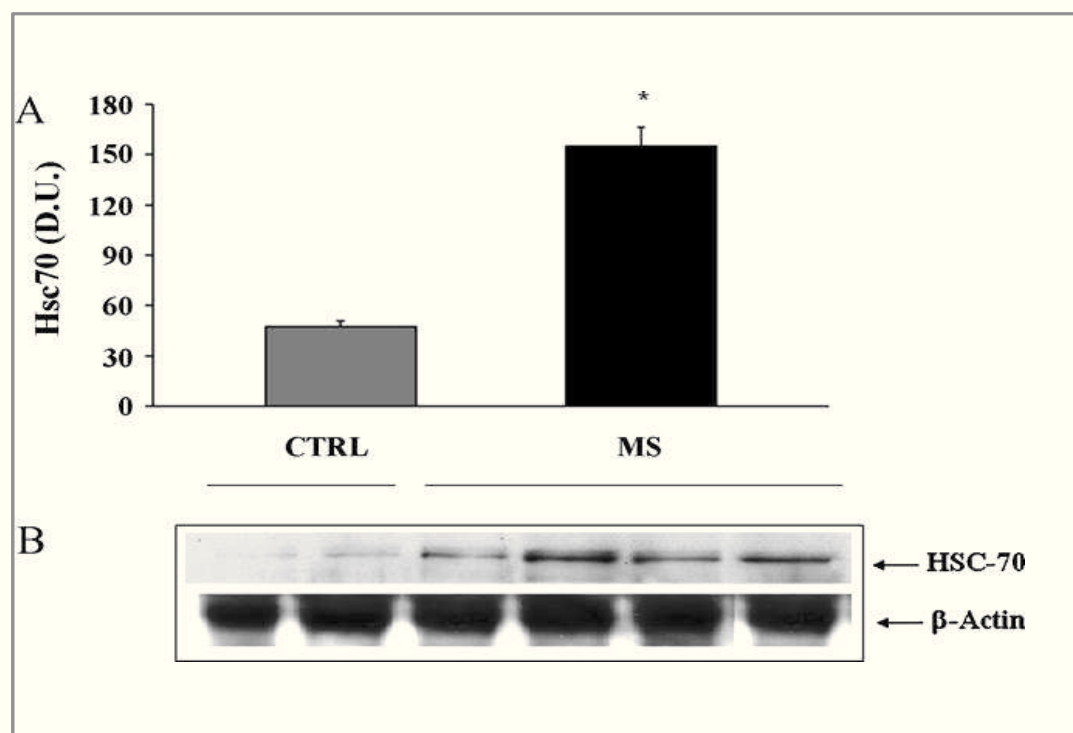
**Figura 20 . Analisi Western blot** (A) Livelli di espressione di HO-1 in CSF di pazienti SM. I livelli di espressione dell'HO-1 di campioni di CSF sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard.

**Figure 20 Western blot assay.** (A) Heme oxygenase-1 (HO-1) levels in the CSF of MS patients. CSF samples were assayed for HO-1 by Western blot. (B) A representative immunoblot is shown. b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses per group.  $P < 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control; St, standard.



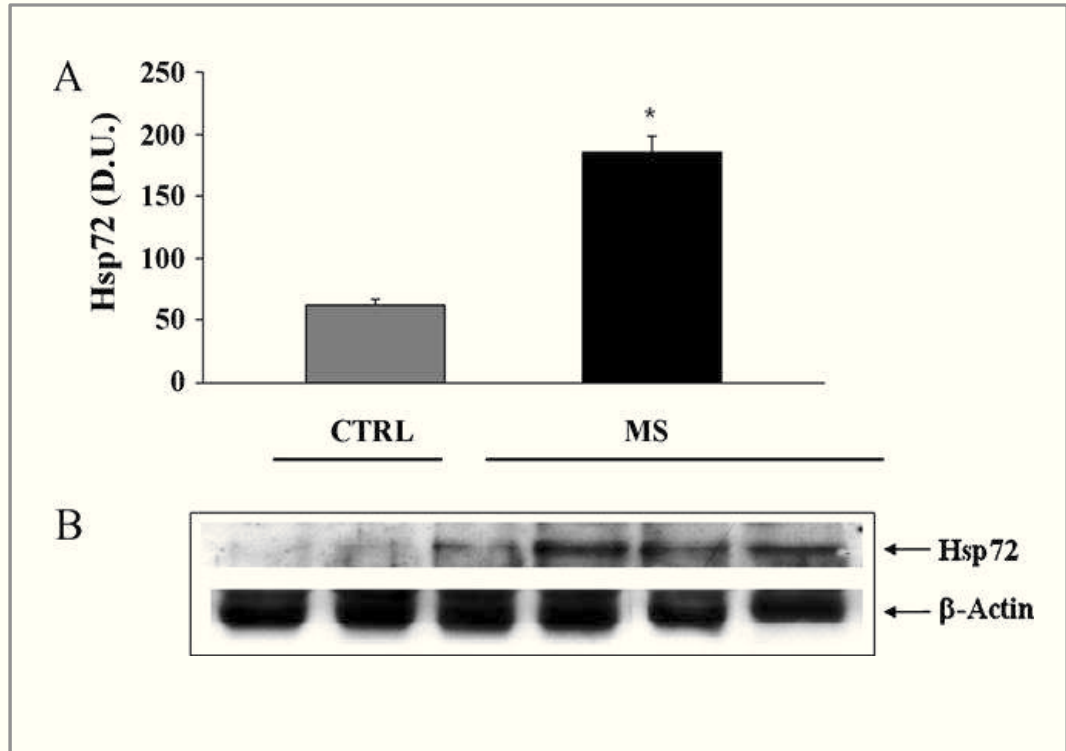
**Figura 21. Analisi Western blot.** Livelli di espressione di proteine carbonilate e HNE in CSF di pazienti SM. Le proteine carbonilate (A,B) e l'HNE (C,D) di campioni di CSF sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B,D). Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.. \*P < 0.05 vs controlli

**Figure 21 Western blot assay.** Protein carbonyls and HNE (4-hydroxy-2-nonenals) levels in the CSF of MS patients. CSF samples were assayed for protein carbonyls (A, B), and HNE (C, D) by Western blot. Representative immunoblots are shown (B, D). The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses  $P \leq 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control



**Figura 22 Analisi Western blot.** (A) Livelli di espressione di Hsc-70 nei linfociti di pazienti SM. I livelli di espressione dell'Hsc-70 di campioni di linfociti sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard.

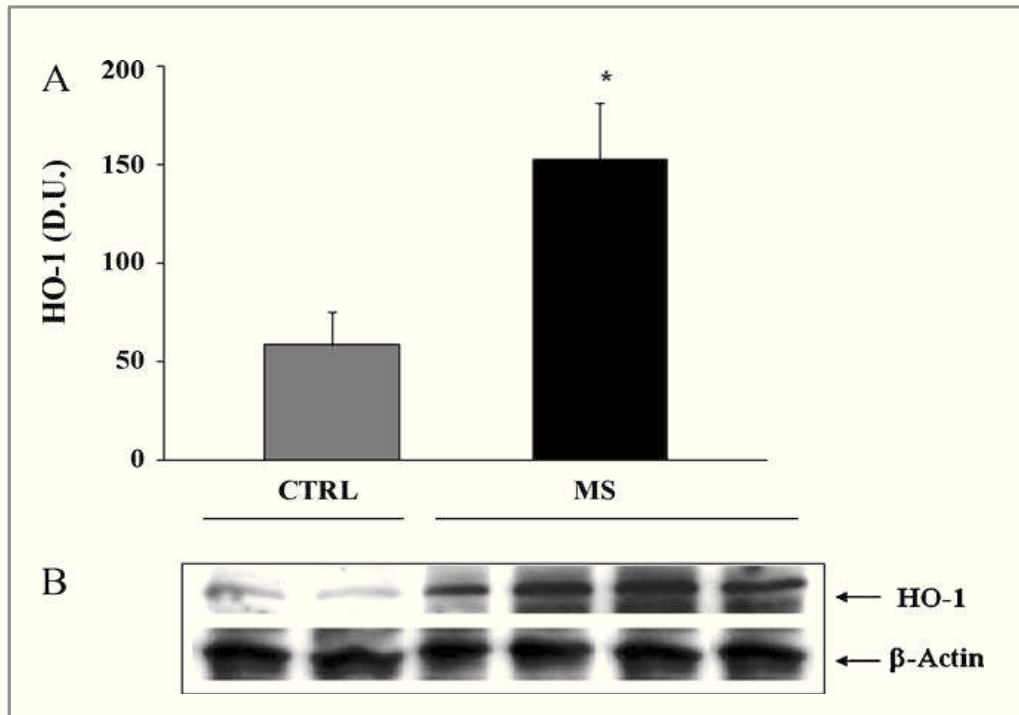
**Figure 22 Western blot assay.** (A) Heat shock protein 70 (Hsc70) levels in MS lymphocytes. Lymphocytes were assayed for Hsc-70 by Western blot. (B) A representative immunoblot is shown. b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P < 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control.



**Figura 23 Analisi Western blot** (A) Livelli di espressione di Hsp-72 nei linfociti di pazienti SM. I livelli di espressione dell'Hsp-72 di campioni di linfociti sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard.

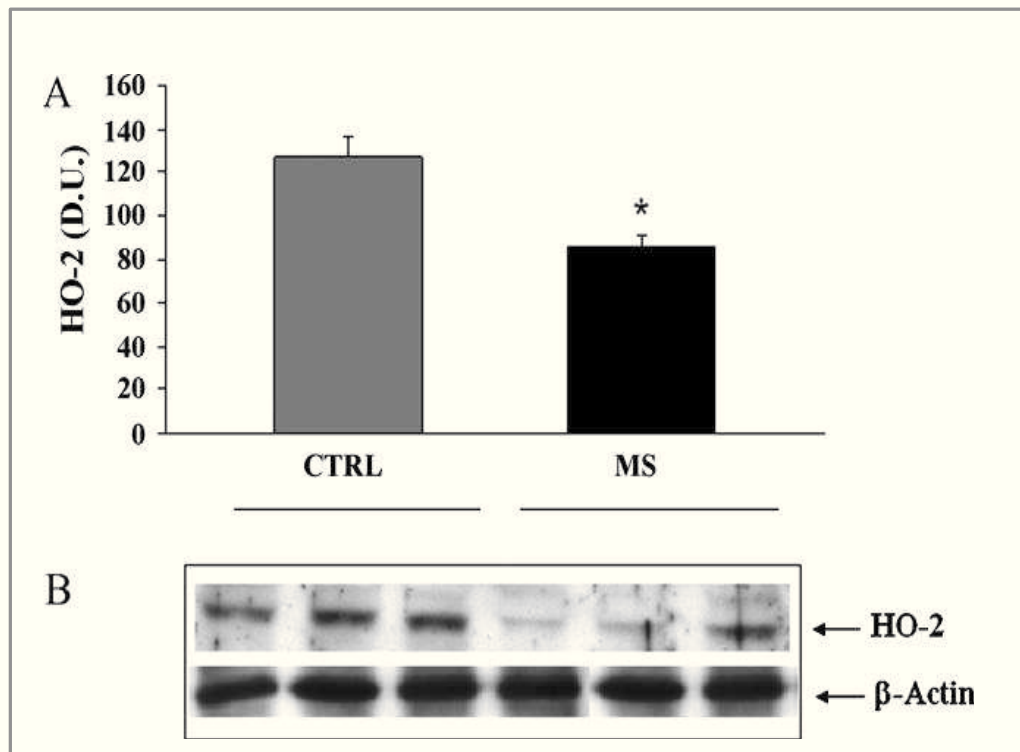
**Figure 23 Western blot assay.** (A) Heat shock protein 72 (Hsp72) levels in multiple sclerosis patients. Lymphocytes samples were assayed for Hsc-72 by Western blot. (B) A representative immunoblot is shown. b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent

analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P < 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control.



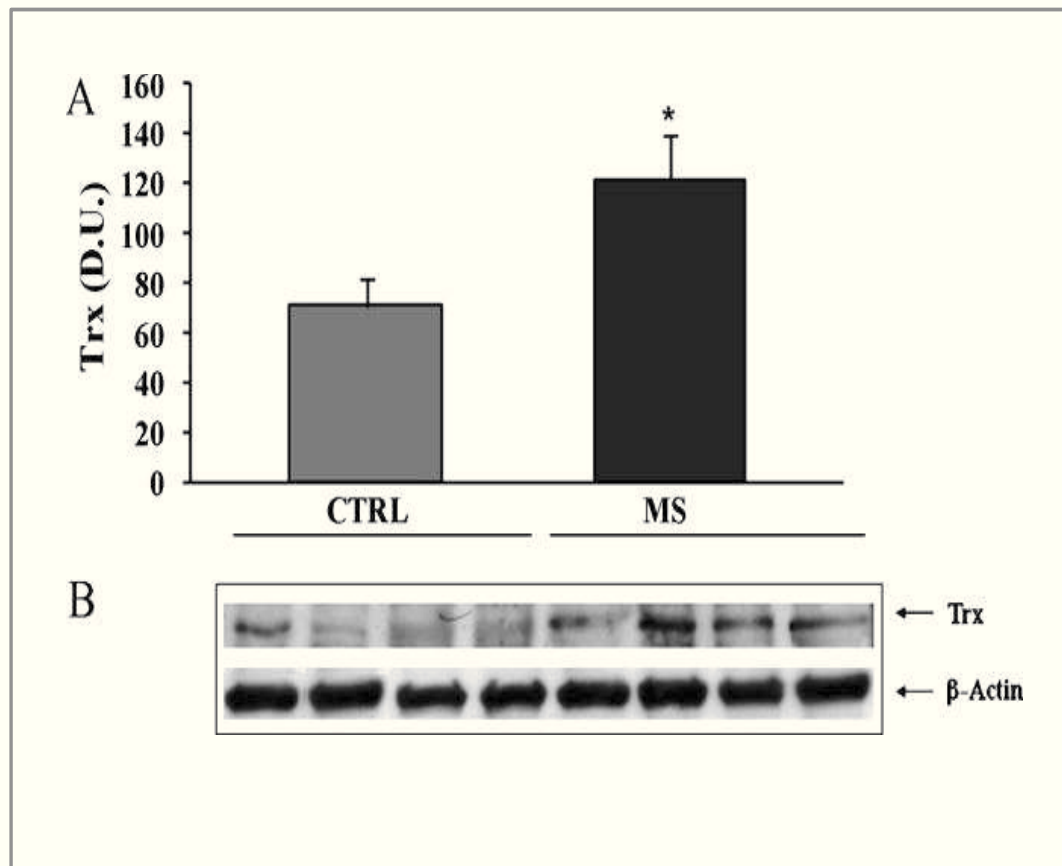
**Figura 24. Analisi Western blot.** (A) Livelli di espressione di HO-1 nei linfociti di pazienti SM. I livelli di espressione dell'HO-1 di campioni di linfociti sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard

**Figure 24 Western blot assay.** (A) Heme oxygenase-1 (HO-1) levels in lymphocytes of MS patients. Lymphocytes samples were assayed for HO-1 by Western blot. (B) A representative immunoblot is shown. b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P < 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control.



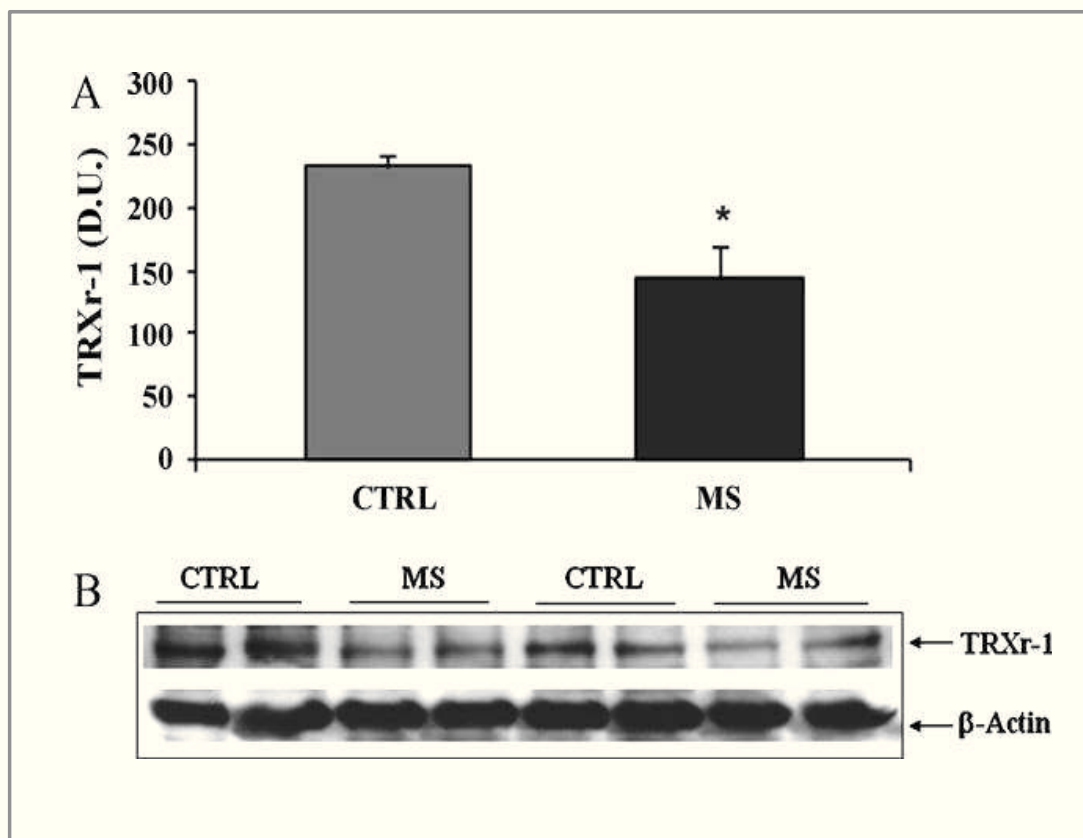
**Figura 25. Analisi Western Blot.** (A) Livelli di espressione di HO-1 nei linfociti di pazienti SM. I livelli di espressione dell'HO-1 di campioni di linfociti sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard

**Fig.25 Western blot assay.** (A) Heme oxygenase-2 (HO-2) levels in lymphocytes of MS patients. Lymphocytes samples were assayed for HO-2 by Western blot. (B) A representative immunoblot is shown. b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P \leq 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control.



**Figura 26. Analisi Western blot.** (A) Livelli di espressione della Trx nei linfociti di pazienti SM. I livelli di espressione della Trx di campioni di linfociti sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard

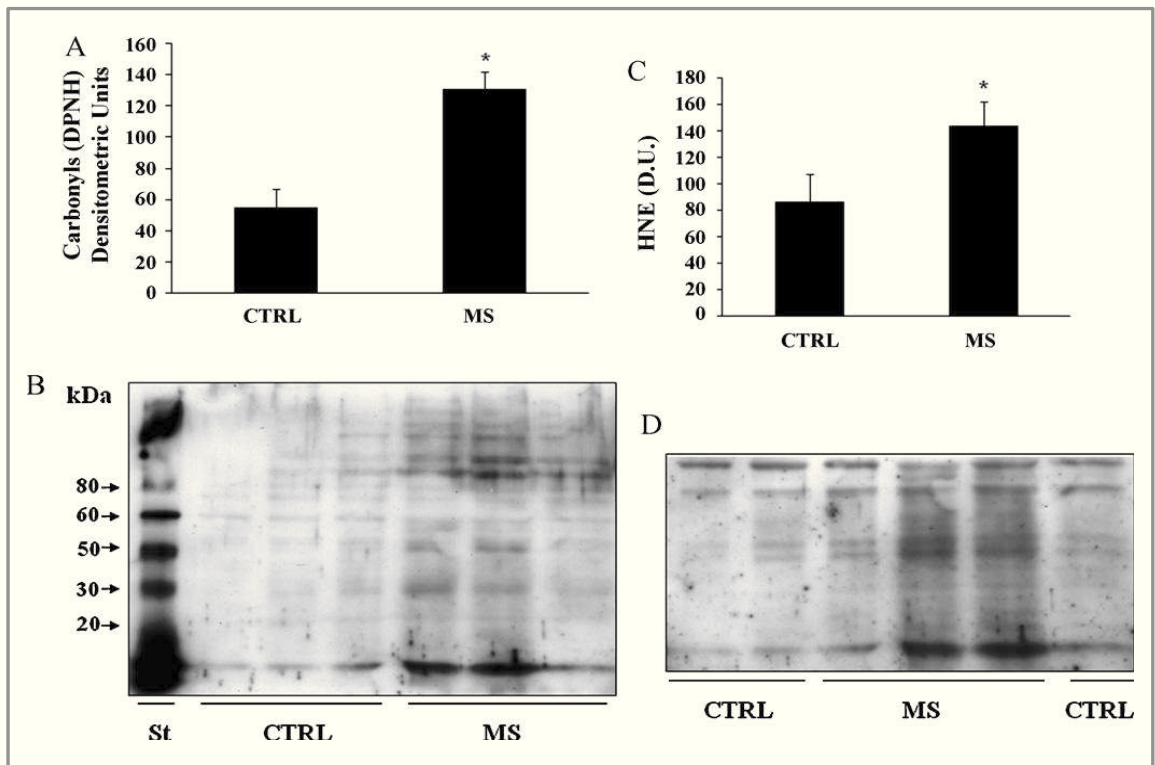
**Figure 26. Western blot assay.** (A) Thioredoxin (Trx) levels in lymphocytes from multiple sclerosis patients. Lymphocytes samples were assayed for Trx by Western blot (B) A representative immunoblot is shown. b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P \leq 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control.



**Figura 27. Analisi Western blot.** (A) Livelli di espressione di TrxR-1 nei linfociti di pazienti SM. I livelli di espressione dell'TrxR-1 di campioni di linfociti sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard

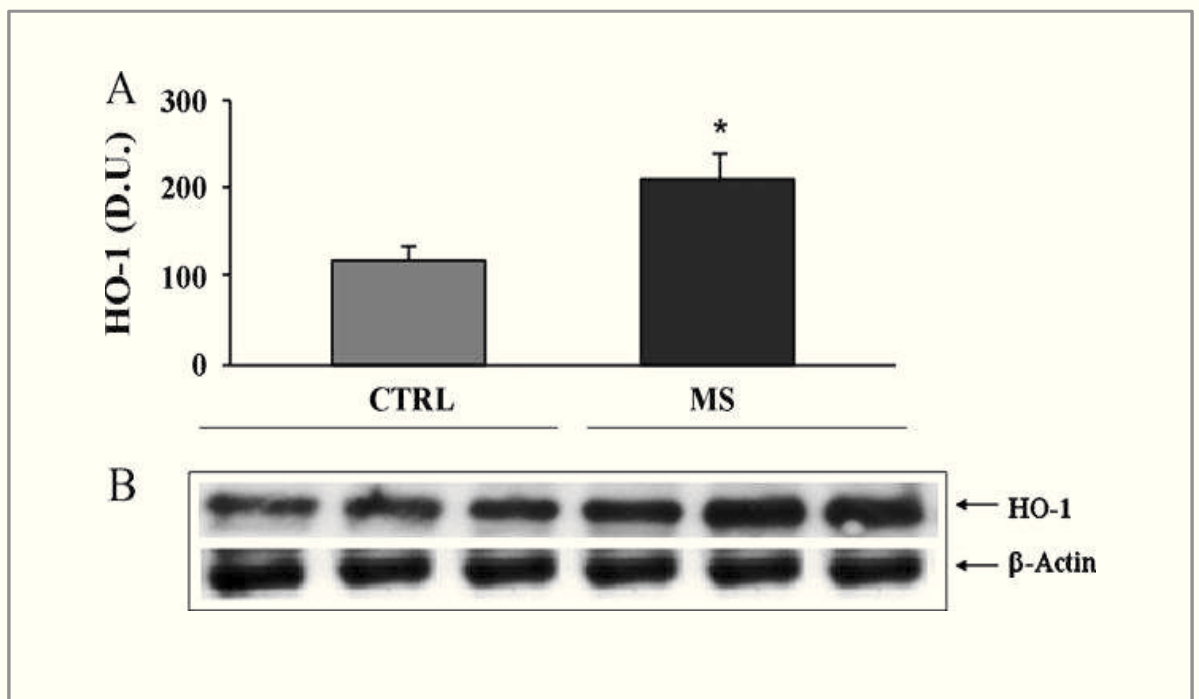
**Figure 27 Western blot assay.** (A) Thioredoxin reductase-1 (TrxR-1) levels in lymphocytes from patients with multiple sclerosis. Lymphocytes samples were assayed for TrxR-1 by Western blot (B) A representative immunoblot is shown. b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P < 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control.





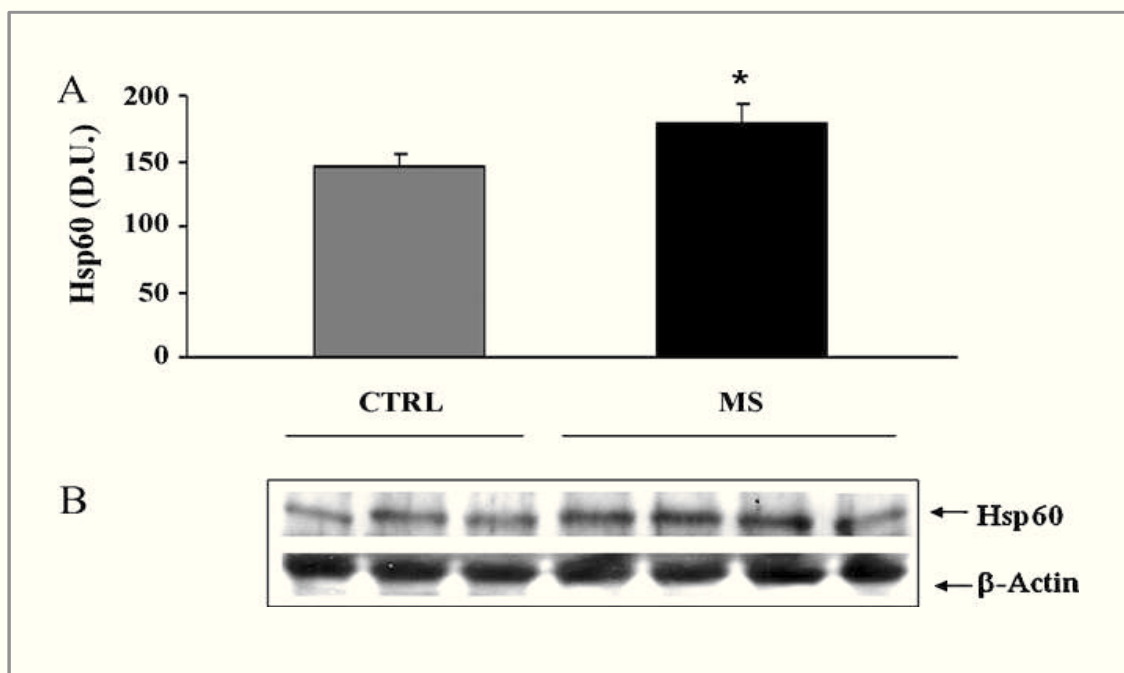
**Figura 28. Analisi Western blot.** Analisi Livelli di espressione di proteine carbonilate (DPNH) e HNE nei linfociti pazienti SM. Le proteine carbonilate (A,B) e l'HNE (C,D) di campioni di linfociti sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B,D). Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.. \*P < 0.05 vs controlli

**Figure 28 Western blot assay.** (A) Protein carbonyls (DPNH) and (C) HNE levels in lymphocytes from multiple sclerosis and control patients. Lymphocytes samples were assayed for carbonyls and HNE by Western blot. Representative immunoblots are shown (B, D). The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P \leq 0.05$  vs control. D.U., densitometric units, MS, multiple sclerosis; CTRL, control; St, standard.



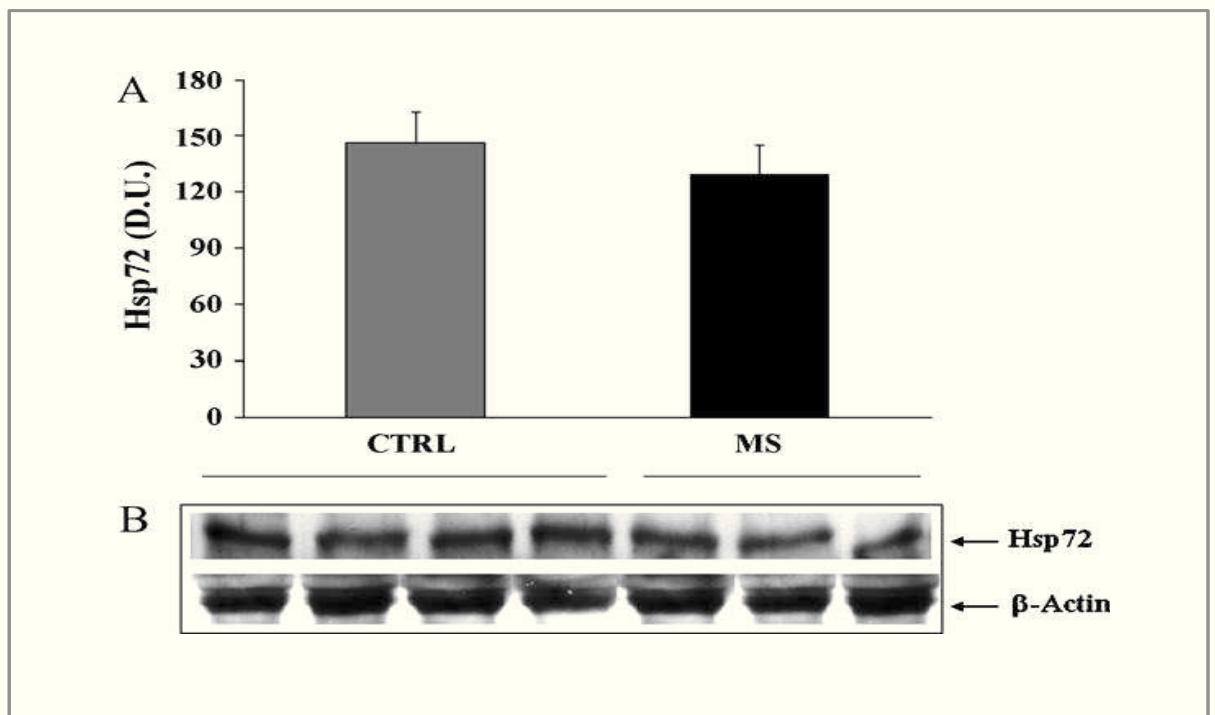
**Figura 29. Analisi Western Blot.** (A) Livelli di espressione di HO-1 nei plasma di pazienti SM. I livelli di espressione dell'HO-1 di campioni di plasma sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard

**Figure.29. Western blot assay.** (A) Heme oxygenase-1 (HO-1) levels in plasma from multiple sclerosis patients. Plasma samples were assayed for HO-1 by Western blot. (B) A representative immunoblot is shown. b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P \leq 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control.



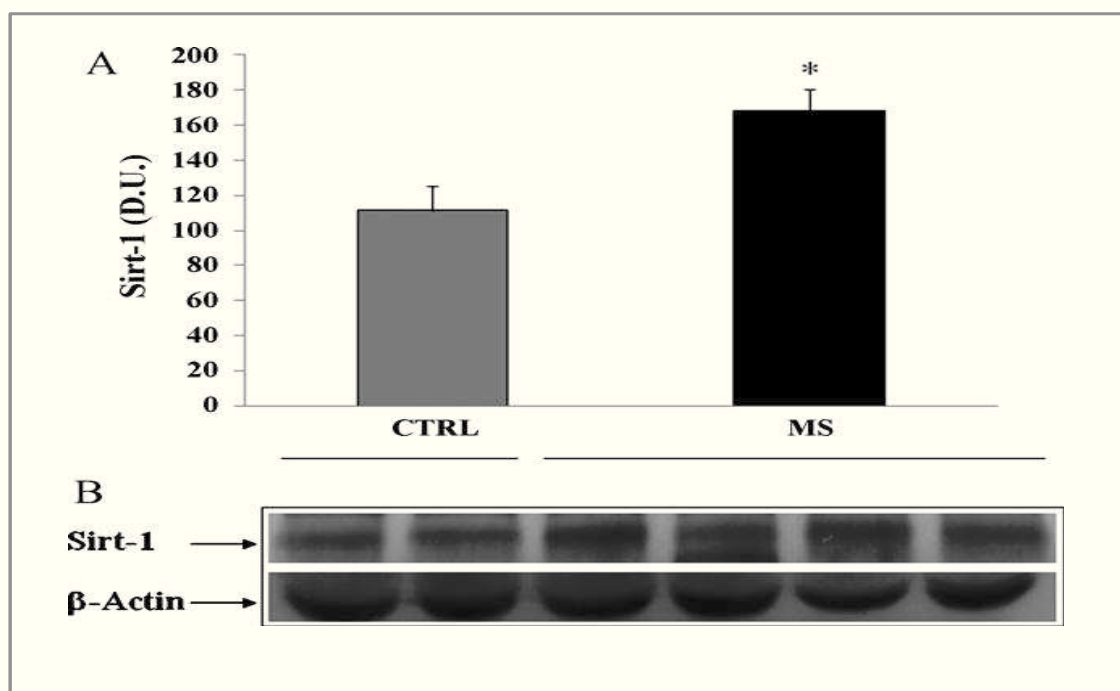
**Figura 30. Analisi Western blot.** (A) Livelli di espressione dell'Hsp-60 nel plasma di pazienti SM. I livelli di espressione dell'Hsp-60 di campioni di plasma sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard

**Figure 30 Western blot assay.** (A) Heat shock protein 60 (Hsp60) levels in plasma from multiple sclerosis patients. Plasma samples from multiple sclerosis patients and control subjects were assayed for Hsp60 by Western blot. A representative immunoblot is shown in (B). b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P \leq 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control.



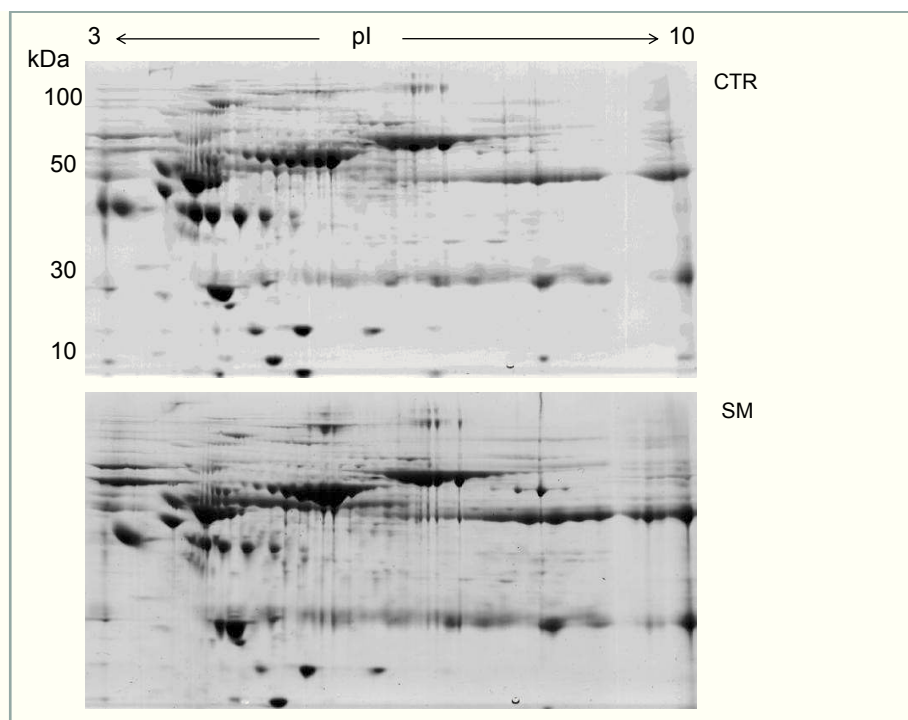
**Figura 31. Analisi Western blot.** (A) Livelli di espressione dell'Hsp-72 nel plasma di pazienti SM. I livelli di espressione dell'Hsp-72 di campioni di plasma sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard

**Figure 31 Western blot assay.** (A) Heat shock protein 72 (Hsp72) levels in plasma from multiple sclerosis patients. Plasma samples were assayed for Hsp72 by Western blot . A representative immunoblot is shown in (B). b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P \_ 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control.



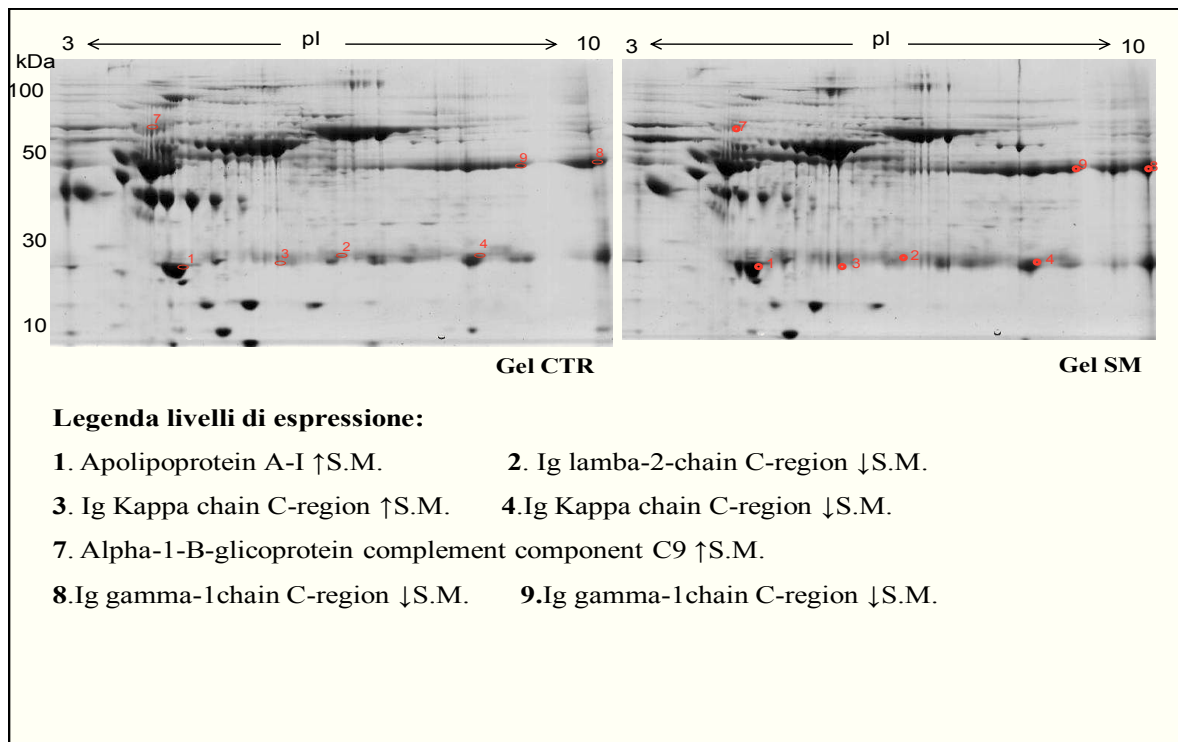
**Figura 32. Analisi Western blot.** (A) Livelli di espressione delle Sirtuin-1 nel plasma di pazienti SM. I livelli di espressione delle Sirtuin-1 di campioni di plasma sono stati misurati mediante analisi Western Blot (B) utilizzando uno specifico anticorpo. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.  $P < 0.05$  vs i controlli. D.U., unità densitometrica; MS, sclerosi multipla; CTRL, controlli; St, standard

**Figure 32 Western blot assay.** (A) Sirtuin-1 (Sirt-1) levels in plasma from multiple sclerosis patients. Plasma samples were assayed for Sirt-1 by Western blot. A representative immunoblot is shown in (B). b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group.  $P \leq 0.05$  vs control. D.U., densitometric units; MS, multiple sclerosis; CTRL, control.



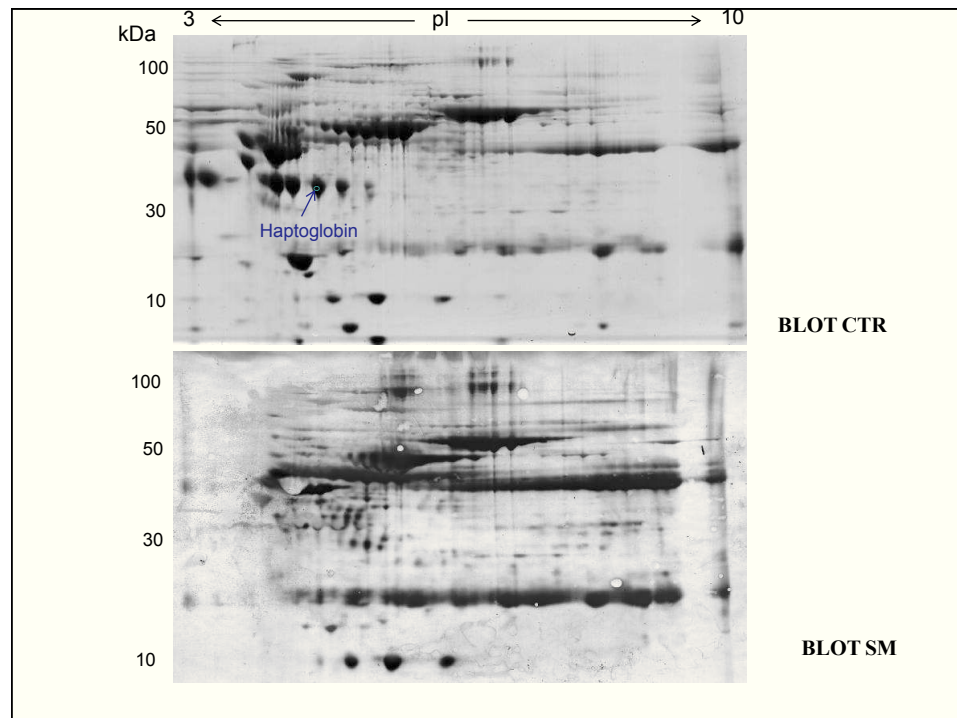
**Figura .33** Profili di espressione ottenuti dalla elettroforesi 2D di campioni di siero controllo (CTR) e pazienti di affetti da Sclerosi Multipla. Le proteine (100 µg) sono state separate mediante elettroforesi bidimensionale. Per la prima dimensione il campione è stato depositato su strip IPG con un gradiente di pH 3-10, successivamente la separazione è stata condotta su gel SDS-PAGE 12% che infine è stato colorato con Biosafe Coomassie. Da tale immagine emerge come il profilo di espressione delle proteine dei campioni controllo sia simile a quello dei campioni di Sclerosi multipla.

**Figure 33** Expression profiles obtained from 2D electrophoresis of serum samples from control (CTR) and patients with Multiple Sclerosis.



**Figura 34** Mappe 2D di campioni provenienti da siero di campioni CTR e SM. Le proteine (100 microgrammi) estratti sono stati analizzati nella prima dimensione (pH 3-10 IPG lineare); seconda dimensione è stata eseguita su lastra di gel (12% di pendenza SDS-PAGE). La rilevazione della proteina è stata ottenuta utilizzando una colorazione Biosafe Coomassie. I cerchi rossi indicano le proteine che mediante analisi densitometrica appaiono differentemente espresse tra campioni CTR e SM.

**Figure 34** 2D maps of samples from serum samples and SM CTR



**Figura 35** 2D immunoblot di carbonili di campioni CTR e SM. La spot (cerchio blu) che mostra un aumento significativo dei livelli di carbonile tra i casi SM e CTR sono etichettate

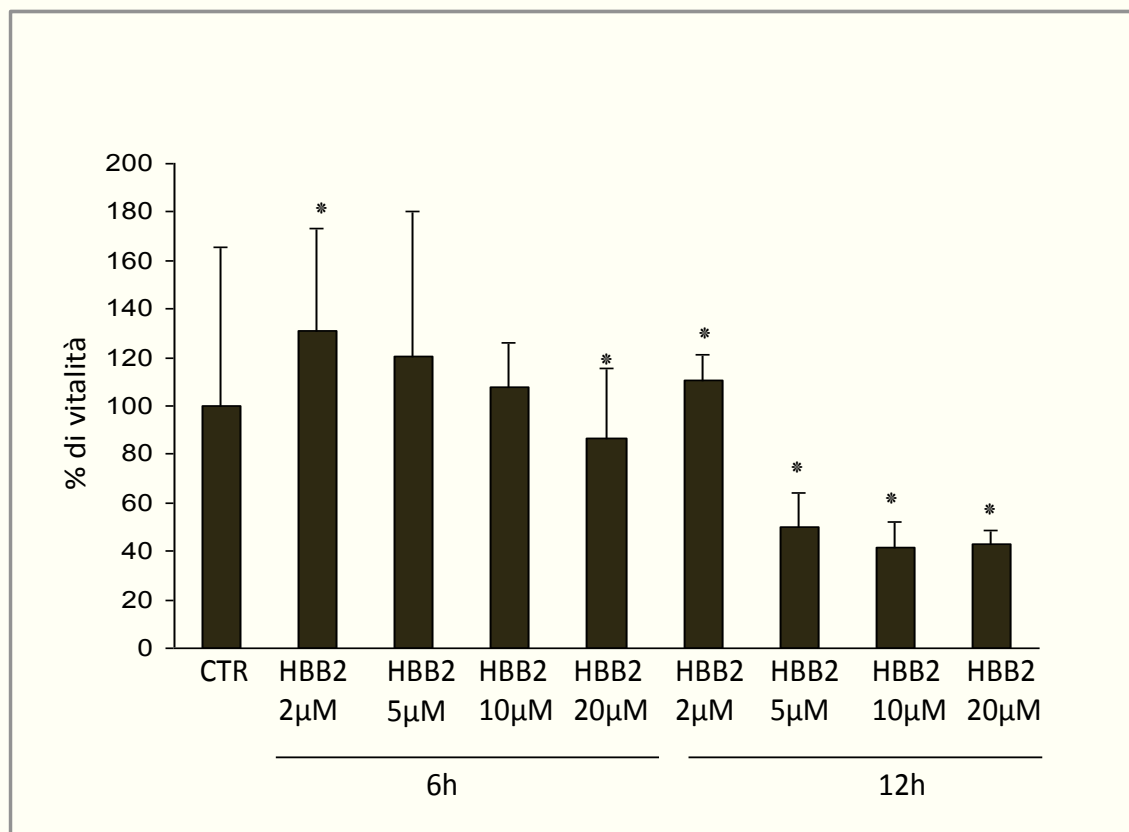
**Figure 35** Two-dimensional carbonyl immunoblots from CTR and SM. Relative change in carbonyl immunoreactivity, after normalization of the immunostaining intensities to the protein content.



Spot n.	Proteina identificata	SwissProt code	Mw/pI teorici	Score	Copertura di sequenza %
CTR expr					
1	Apolipoprotein A-I	P02647	30759/5.56	195	44
2	Ig lambda-2 chain C regions	P0CG05	11458/6.9211	68	46
	Ig lambda-3 chain C regions	P0CG06	402/6.921144	68	46
	Ig lambda-6 chain C region	P0CF74	1/6.92	68	46
3	Ig kappa chain C region	P01834	11773/5.58	73	48
4	Ig kappa chain C region	P01834	11773/5.58	71	48
7	Alpha-1B-glycoprotein	P04217	54809/5.5864	82	17
	Complement component C9	P02748	615/5.43	52	8
8	Ig gamma-1 chain C region	P01857	36596/8.46	144	37
9	Ig gamma-1 chain C region	P01857	36596/8.46	109	30
CTR carb					
12	Haptoglobin	P00738	45861/6.13	153	38

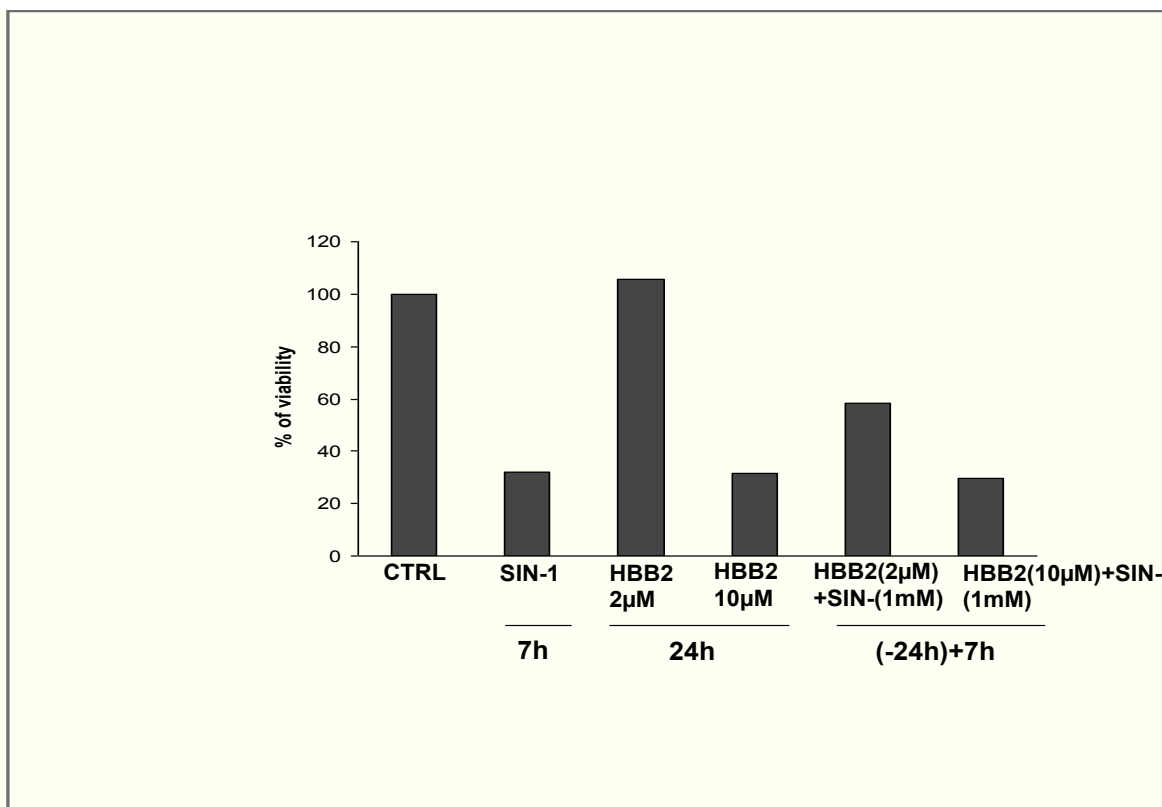
**Tabella 5** Sintesi delle proteine identificate dalla proteomica che sono differenzialmente espressi nel siero dei pazienti CTR e SM

**Table 5** Summary of the Proteins Identified by Proteomic and Redox Proteomics that are increasingly express and are Increasingly Carbonylated in the Hippocampus from control vs SM patients



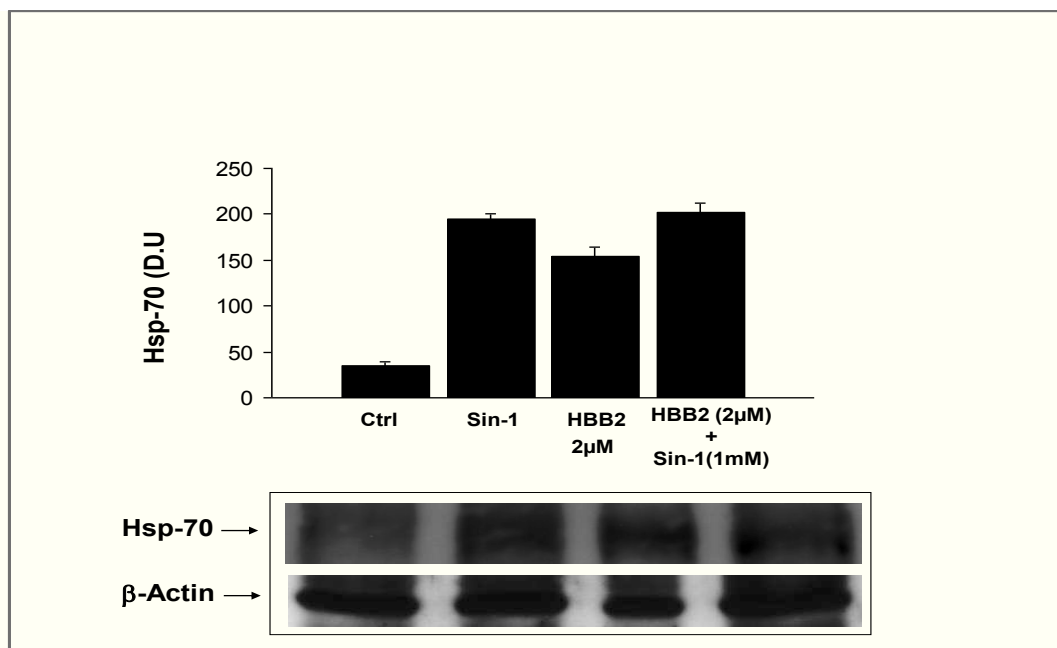
**Figura 36 Saggio di Vitalità cellulare (MTT).** Vitalità cellulare Dose-dipendente dell'HBB2 in cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y. Le cellule SH-SY5Y sono state esposte a differenti concentrazioni di HBB2 per 6 e 12 h. \* $P > 0.05$  vs Controlli.

**Figure 36 Vitality cellular assay (MTT).** Effect dose-response of HBB2 on cell viability . SH-SY5Y were incubated with absent or present HBB2(2µM, 5 µM;10µM; 20 µM ) for 6 and 12 h. \* $P < 0.05$  vs. control.



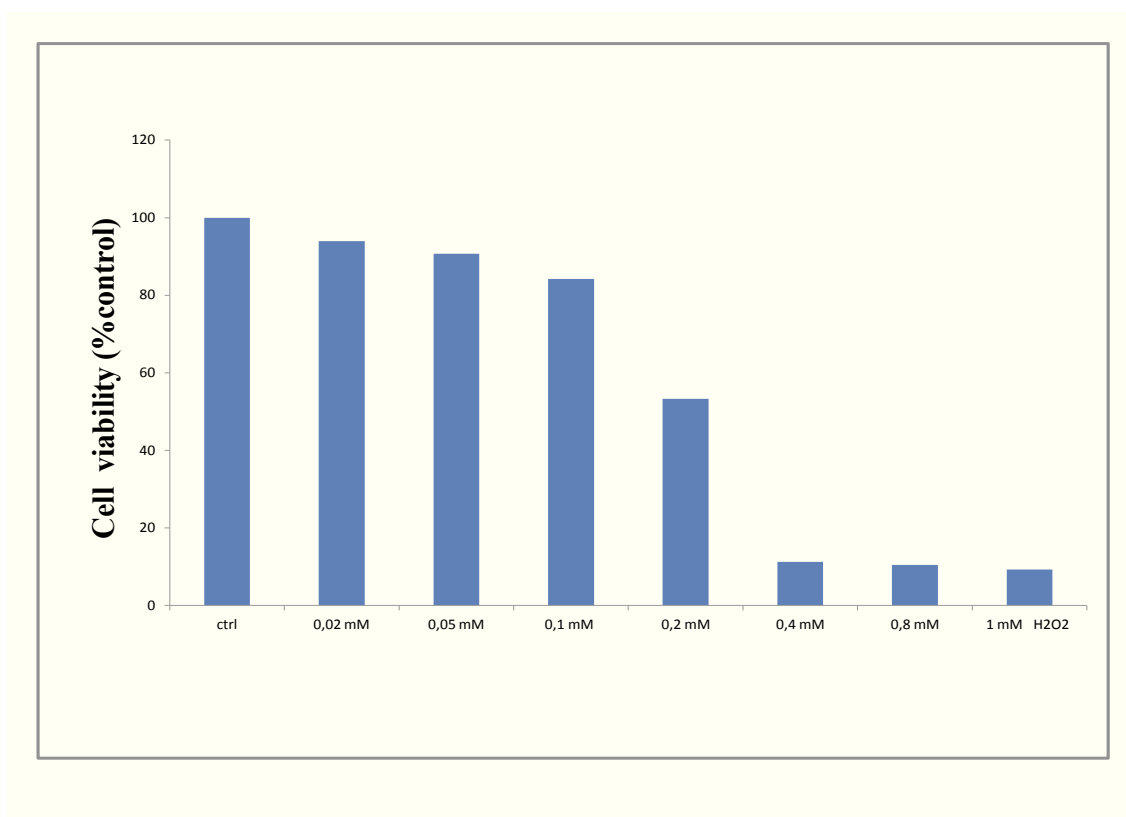
**Figure 37 Saggio di Vitalità cellulare (MTT).** Vitalità cellulare dopo trattamento con SIN-1(1mM) (7h) in presenza ed in assenza di pretrattamento con HBB2(24h), a diverse concentrazioni (2µM, 10µM ), e con HBB2 (2µM, 10µM) da solo per 24h in cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y. \*P>0.05 vs Controlli.

**Figure 37 Vitality cellular assay (MTT).** Effect of HBB2 on cell viability after oxidative damage induced by SIN-1 treatment. SH-SY5Ys were incubated with absent or present HBB2(2µM, 10µM ) for 24 h. and only HBB2 ((2µM, 10µM ) ( 24h). SH-SY5Y \*P < 0.05 vs. control;



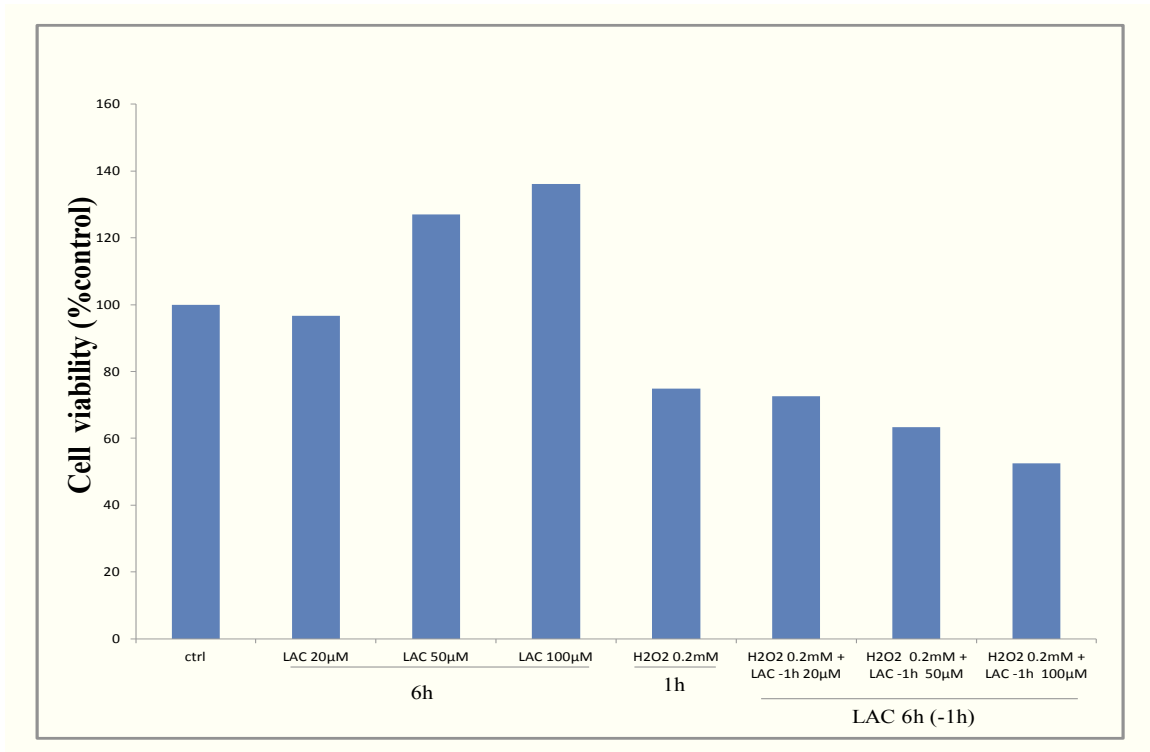
**Figura 38 Analisi Western blot.** I livelli di Hsp70 sono stati misurati utilizzando uno specifico anticorpo. Il grafico mostra i livelli di Hsp70 in SH-SY5Y, in presenza ed in assenza di trattamento con HBB2 (2µM) (24h) e/o sottoposte a stress nitro sativo (SIN-1)(7h). Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti. \*P < 0.01 verso i controlli . \*P < 0.05 vs cell treatment.

**Figure 38 Western Blot assay.** Hsp-70 levels in SH-SY5Y cells after oxidative damage induced by SIN-1 (1mM) (7h) treatment. SH-SY5Y were incubated with absent or present HBB2(2µM) for 24 h. and only HBB2 (2µM) (24h)A representative immunoblot is shown in b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses on twenty-two/twenty-six patients per group. P ≤0.05 vs control. D.U., densitometric units; CTRL, control



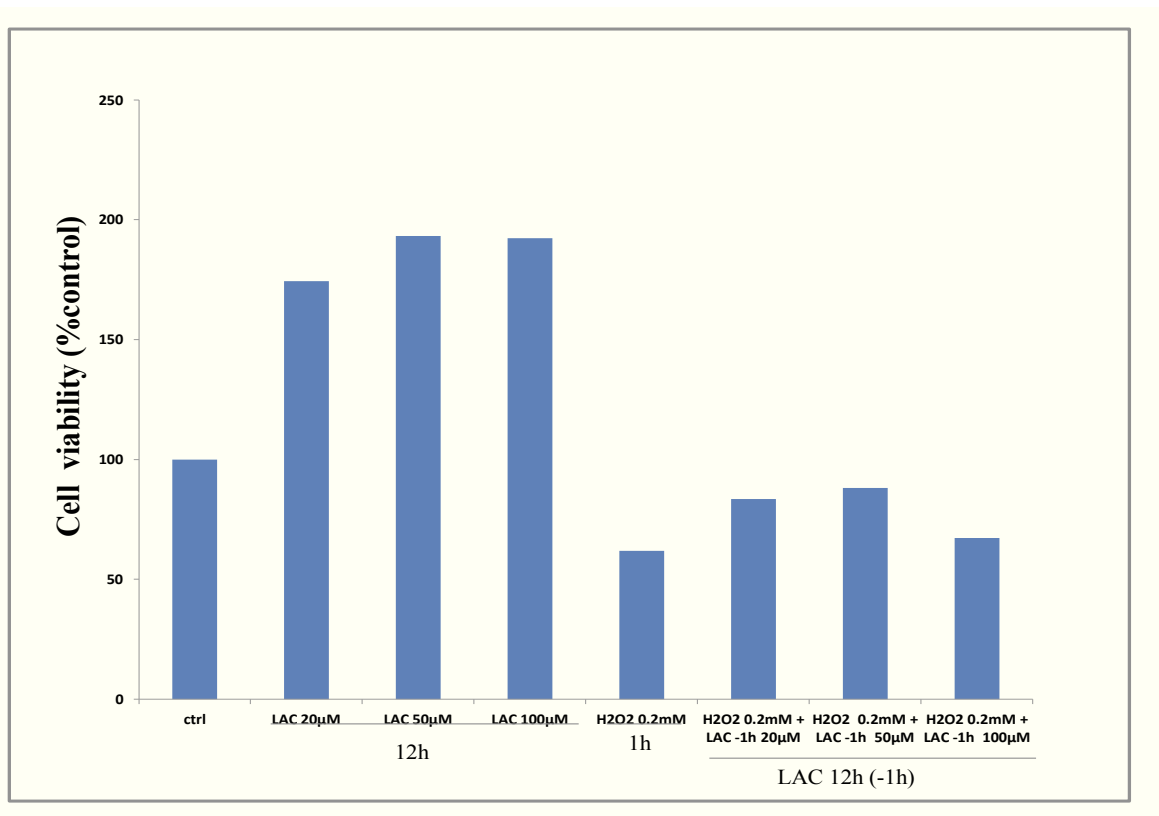
**Fig. 39 Saggio di Vitalità cellulare (MTT).** Vitalità cellulare Dose-dipendente dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y. Le cellule SH-SY5Y sono state esposte a differenti concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 24 h. \*P>0.05 vs Controlli.

**Figure 39 Vitality cellular assay (MTT).** Effect dose- response of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell viability. SH-SY5Ys were incubated different concentration H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,02µM, 0,05 µM; 0,1 µM; 0,2 µM; 0,4 µM;0,8 µM; 1mM ) for 24 h. \*P < 0.05vs Control



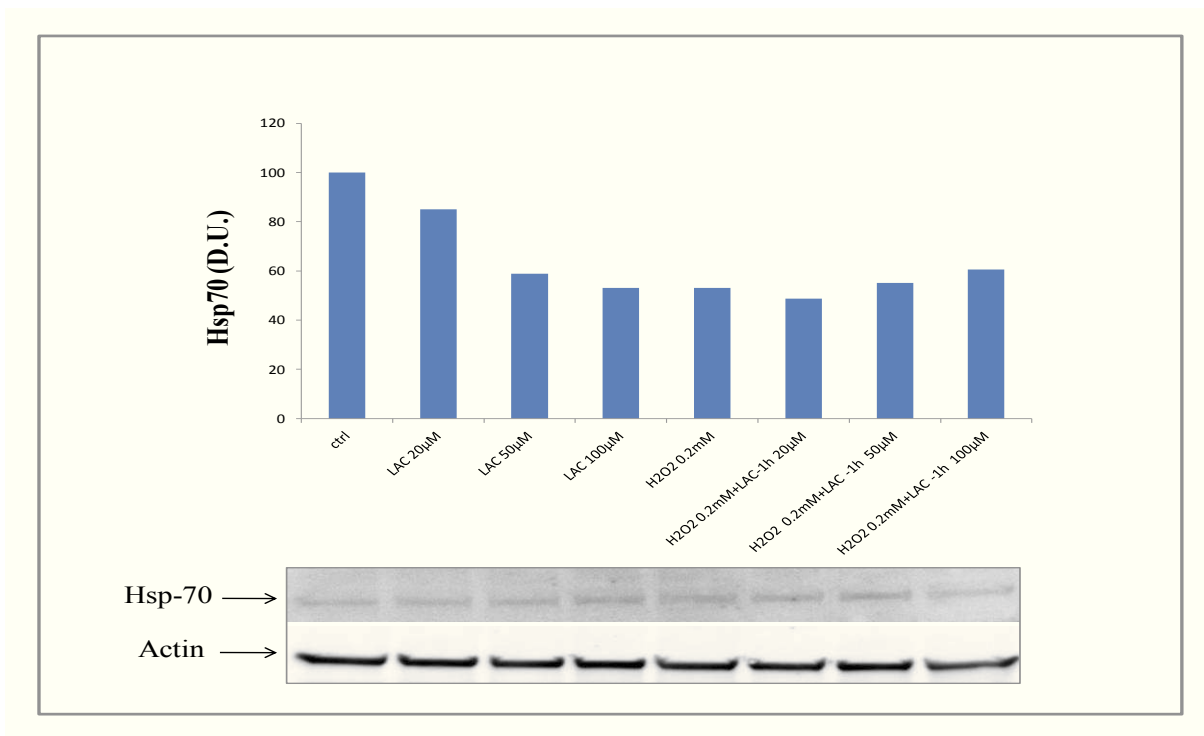
**Fig 40 Saggio di Vitalità cellulare (MTT).** Vitalità cellulare dopo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) in presenza ed in assenza di pretrattamento con LAC(6h), a diverse concentrazioni (20µM, 50µM, 100µM), e con LAC (20µM, 50µM, 100µM) da solo per 6h in cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y. \*P>0.05 vs Controlli.

**Figure 40 Vitality cellular assay (MTT).** Effect of HBB2 on cell viability after oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) treatment. SH-SY5Y were incubated with absent or present LAC (20µM, 50µM, 100µM) for 6 h. and only LAC (20µM, 50µM, 100µM) (6h)..\*P < 0.05 vs. control.



**Fig 41 Saggio di Vitalità cellulare (MTT).** Vitalità cellulare dopo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) in presenza ed in assenza di pretrattamento con LAC(6h), a diverse concentrazioni (20µM, 50µM, 100µM), e con LAC (20µM, 50µM, 100µM) da solo per 6h in cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y. \*\*P>0.05 vs Controlli.

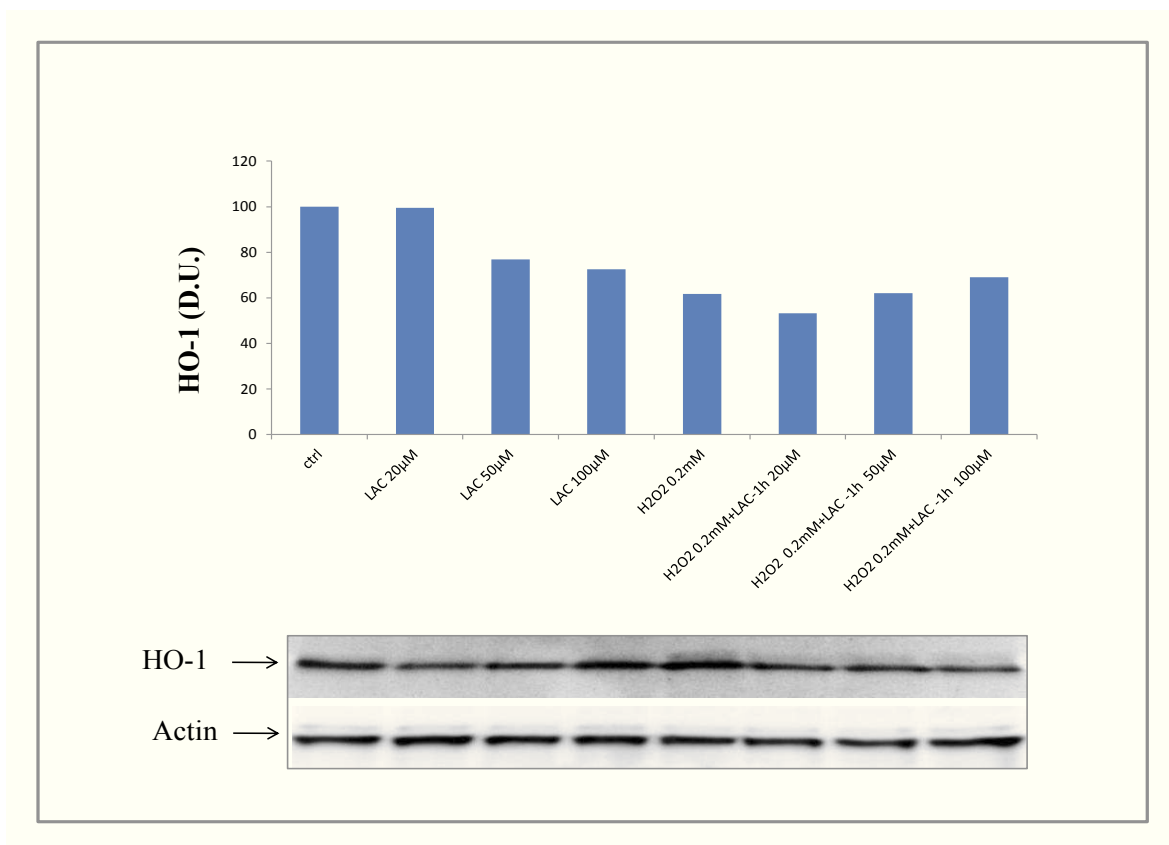
**Figure 40 Vitality cellular assay (MTT).** Effect of HBB2 on cell viability after oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) treatment. SH-SY5Y were incubated with absent or present LAC (20µM, 50µM, 100µM) for 12 h. and only LAC (20µM, 50µM, 100µM) (12h)..\*P < 0.05 vs. control.



**Fig 42 Analisi Western blot.** Livelli di espressione delle Hsp-70 in cellule umane di neuroblastoma in presenza e in assenza di pretrattamento con LAC (20µM, 50µM, 100µM)(6h) e trattate solo con LAC rispetto ai controlli. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.

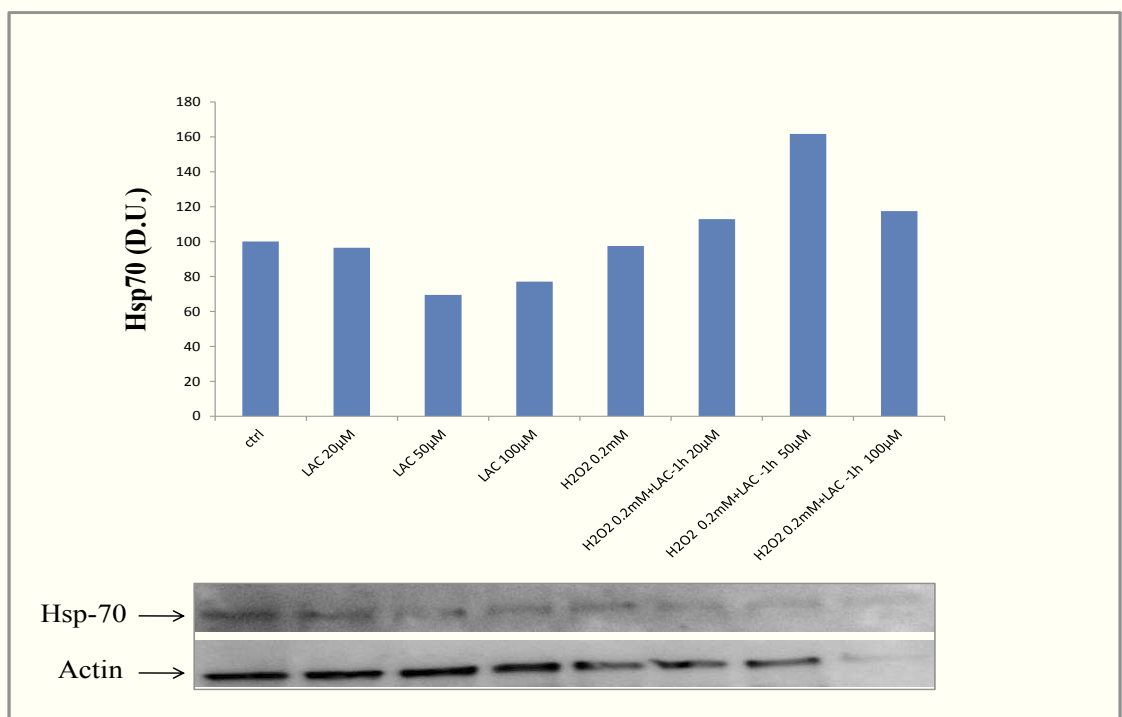
**Figure 42 Western blot assay** Hsp-70 levels in SH-SY5Y cells after oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) treatment. SH-SY5Y were incubated with absent or present LAC (20µM, 50µM, 100µM ) for 6 h. and only LAC (20µM, 50µM, 100µM ) ( 6h)A representative immunoblot is shown in b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses. P ≤0.05 vs control. D.U., densitometric units; CTRL, control.





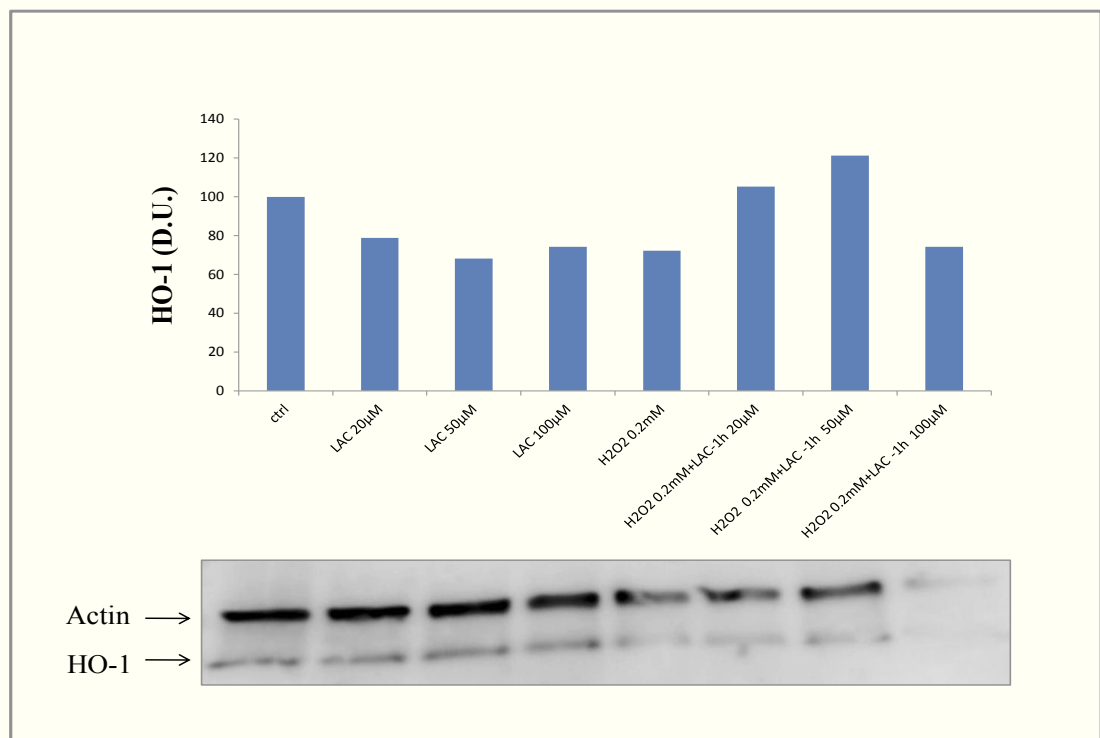
**Fig 43 Analisi Western blot.** Livelli di espressione delle HO-1 in cellule umane di neuroblastoma in presenza e in assenza di pretrattamento con LAC (20μM, 50μM, 100μM)(6h) e trattate solo con LAC rispetto ai controlli. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.

**Figure 43 Western blot assay** HO-1 levels in SH-SY5Y cells after oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) treatment. SH-SY5Y were incubated with absent or present LAC (20μM, 50μM, 100μM ) for 12 h. and only LAC (20μM, 50μM, 100μM ) ( 12h). A representative immunoblot is shown in b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses group. P ≤0.05 vs control. D.U., densitometric units; CTRL, control



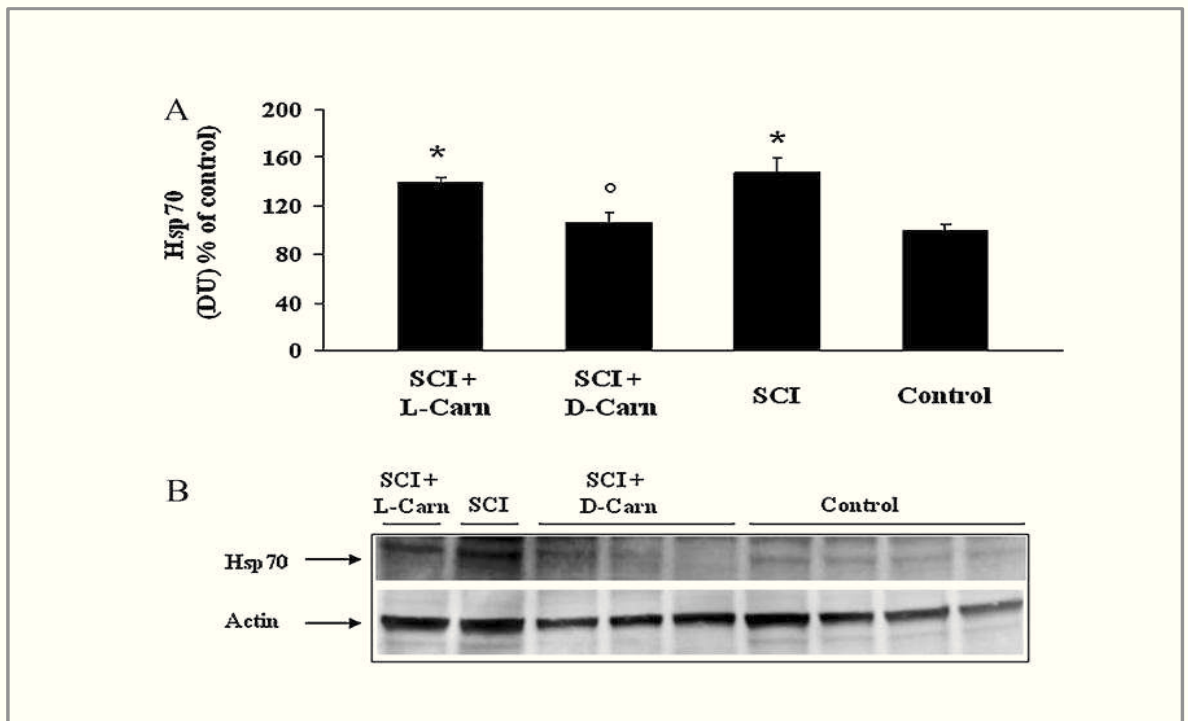
**Fig 44 Analisi Western blot.** Livelli di espressione delle Hsp-70 in cellule umane di neuroblastoma in presenza e in assenza di pretrattamento con LAC (20µM, 50µM, 100µM)(12h) e trattate solo con LAC rispetto ai controlli. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.

**Figure 44 Western blot assay** Hsp-70 levels in SH-SY5Y cells after oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) treatment. SH-SY5Y were incubated with absent or present LAC (20µM, 50µM, 100µM ) for 12 h. and only LAC (20µM, 50µM, 100µM ) ( 12h)A representative immunoblot is shown in b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses . P ≤0.05 vs control. D.U., densitometric units; CTRL, control



**Fig 45 Analisi Western blot dell'HO-1** . Livelli di espressione delle HO-1 in cellule umane di neuroblastoma in presenza e in assenza di pretrattamento con LAC (20µM, 50µM, 100µM) (12h) e trattate solo con LAC rispetto ai controlli. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m). di tre differenti esperimenti.

**Figure 45 Western blot assay.** HO-1 levels in SH-SY5Y cells after oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2mM) (-1h) treatment. SH-SY5Y were incubated with absent or present LAC (20µM, 50µM, 100µM ) for 12 h. and only LAC (20µM, 50µM, 100µM ) ( 12h)A representative immunoblot is shown in b-Actin has been used as loading control. The bar graph shows the densitometric evaluation and values are expressed as mean standard error of mean of 3 independent analyses. P ≤0.05 vs control. D.U., densitometric units; CTRL, control



**Figura 46 Analisi Western blot delle Hsp70.** I livelli di Hsp70 sono stati misurati utilizzando uno specifico anticorpo. Il grafico mostra i livelli di Hsp70 24 h dopo SCI, in presenza ed in assenza di trattamento con D-carnosina o L-carnosina. Le barre del grafico rappresentano i valori densitometrici delle bande specifiche dopo normalizzazione con i valori densitometrici dell'actina utilizzata come controllo per la concentrazione proteica dei campioni. I valori sono espressi come la media (s.e.m.) di tre differenti esperimenti. \*P < 0.01 verso i controlli. \*P < 0.05 vs SCI per il gruppo di animali trattati.

**Figure. 46. Western Blot assay.** Analysis of Hsp70. Hsp70, protein levels were measured by western blot using specific antibodies. (A) Hsp70 expression 24 h after SCI, in absence and presence of treatment with D-carnosine or L-carnosine. Bar graphs represent the densitometric evaluation of specific bands after normalization with the densitometric values of b-actin, used as a loading control. Values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. of six separate experiments. A representative immunoblot is shown (B). \*P < 0.01 versus control. \*P < 0.05 vs SCI operated animal group.



## BIBLIOGRAFIA

1. Douglas C. Wallace. 2005. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine *Annu Rev Genet.* 39: 359.
2. Heng Du, Shirley ShiDu Yana. 2010. Mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 560–572.
3. Zhang, H., Go, Y.M., Jones, D.P. 2007. Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* Epub ahead of print.
4. Poon H.F., Calabrese V., Scapagnini G., and Butterfield DA. 2004. Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J Gerontol* 59:478–493.
5. Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Pennini G., Calafato S., Bellia F., Bates T.E., Giuffrida Stella A.M., Schapira T., Dinkova Kostova A.T., Rizzarelli E. 2008. Cellular stress response: A novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res.* 11064-008-9775-9.
6. Sastre J., Pallardo F.V., and Vina J. 2003. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med* 35:1–8.
7. Halliwell, B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical. Res.* 31:261-272.
8. Kirkwood T.B., 1997. Network Theory of aging.
9. J. Finsterer. 2004. Mitochondriopathies. *European Journal of Neurology.* 11: 163–186
10. Ana Navarro and Alberto Boveris. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C670–C686.
11. Schapira AHV. 2002. The “new” mitochondrial disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72:144–149.
12. Leonard JV, Schapira AHV. 2000. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 355:299–304.
13. Schapira AHV, Cock HR (1999). Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. *Eur J Clin Invest* 29:886–898.
14. Schwartz M, Vissing JN. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347:576–580.
15. Martin-Kleiner I, Gabrilovac J, Bradvica M, Vidovic T, Cerovski B, Fumic K, et al. 2006. Leber’s hereditary optic neuroretinopathy (LHON) associated with mitochondrial DNA point mutation G11778A in two Croatian families. *Coll Antropol*;30: 171–4.

16. Cleren C, Yang L, Lorenzo B, Calingasan NY, Schomer A, Sireci A, et al. 2008. Therapeutic effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism. *J Neurochem*;104:1613–21.
17. Calabrese, V., Scapagnini, G., Giuffrida Stella, A.M., Bates, T.E., Clark, J.B. 2001. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem. Res.* 26:739-764.
18. Cutler, R., Guarante, L.P., Kensler, T.W., Naftolin, F., Jones, D.P., Cantor, C.R., Martin, G.M. 2005. Longevity determinant genes: what is the evidence? What's the importance? Panel discussion. *Ann. N.Y Acad. Sci.* 1055:58-63.
19. Harman, D.A. 1956. A theory based on free radical and radication chemistry. *J. Gerontology* 11:298-300.
20. Calabrese, V., Guagliano, E., Sapienza, M., Mancuso, C., Butterfield, D.A., Stella, A.M. 2006. Redox regulation of cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Ital. J. Biochem.*, 55:263-282.
21. Calabrese, V., Guagliano, E., Sapienza, M., Panebianco, M., Calafato, S., Puleo, E., Pennisi, G., Mancuso, C., Butterfield, D.A., Stella, A.G. 2007. Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochem. Res.*, 32:757-773.
22. Cadet JL, Brannock C. 1998. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int* 32: 117-31.
23. Hawkins, C.L., Davies, M.J. 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504:196-219.
24. Calabrese, V., Bates, T.E., and Giuffrida Stella, A.M. 2000. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: The role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem. Res.* 25:1315-1341.
25. Calabrese, V., Copani, A., Testa, D., Ravagna, A., Spadaro, F., Tendi, E., Nicoletti, V.G., and Giuffrida Stella, A.M. 2000. Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: Effect on heath shock protein 70 synthesis and oxidant/antioxidant balance. *J. Neurosci. Res.* 60:613-622.
26. Calabrese, V., Renis, M., Calderone, A., Russo, A., Reale, S., Barcellona, M.L., and Rizza, V. 1998. Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cell injury after chronic ethanol administration in rat. *Free Rad. Biol. Med.* 24:1159-1167.
27. Levine, R.L., Stadtman, E.R. 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol.* 36:1495-1502.
28. Halliwell, B., and Chirico, S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57:715S.
29. Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59: 1609-1623.

30. Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vécsei, L. 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* Epub ahead of print.
31. Lee, H.C., Wie, Y.H. 2007. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 232:592-606.
32. Butterfield, D.A., Castegna, A., Drake, J., Scapagnini, G., and Calabrese, V. 2002. Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. *Nutr. Neurosci.* 5:229–239.
33. Gonzalez-Gross, M., Marcos, A., and Pietrzik, K. 2001. Nutrition and cognitive impairment in the elderly. *Br. J. Nutr.* 86:313–321.
34. Calabrese, V., and Maines, M.D., 2006. Antiaging medicine: antioxidants and aging. *Antioxid. Redox Signal.* 8:362–364.
35. Hammond, C.L., Lee, T.K., and Ballatori, N. 2001. Novel roles for glutathione I gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J. Hepatol.* 34:946–954.
36. Van Acker, S., van den Berg, D.J., Tromp, M.N., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vugh, W.J.F., and Bast, A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Bio. Med.* 20:331–342.
37. Middleton. 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 439:175–182.
38. Robak, J., and Gryglewski, R.J. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37:837–841.
39. Rafat Husain, S., Cillard, J., and Cillard, J. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry.* 26:2489–2491
40. Youdim, K.A., Shukitt-Hale, B., MacKinnon, S., Kalt, W., and Joseph, J.A. 2000. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* 1523:117–122.
41. Anderson, K.J., Teuber, S.S., Gobeille, A., Cremin, P., Waterhouse, A.L., and Steinberg, S.M. 2001. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *J. Nutr.* 131:2837–2842.
42. Ishige, K., Schubert, D., and Sagara, Y. 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Rad. Biol. Med.* 30:433–446.
43. Stoner, G.D., and Mukhtar, H. 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 22:169–180.
44. Nakatani, N. 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors.* 13:141–146.
45. Ammon, H.P.T., and Wahl, M.A. 1991. Pharmacology of *Curcuma Longa*. *Planta Med.* 57:1–7.
46. Priyadarsini, K.I., Guha, S.N., and Rao, M.N. 1998. Physico-chemical properties and antioxidant activities of methoxy phenols. *Free Radic. Biol. Med.* 24:933–941.



47. Masuda, T., Hidaka, K., Shinohara, A., Maekawa, T., Takeda, Y., and Yamaguchi, H. 1999. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid analysis of radical reaction products from curcumin. *J. Agric. Food Chem.* 47:71–77.
48. Jovanovic, S.V., Boone, C.W., Steenken, S., Trinoga, M., and Kaskey, R.B. 2001. How curcumin works preferentially with soluble antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 123:3064–3068.
49. Jovanovic, S.V., and Simic, M.G. 2000. Antioxidants in nutrition. *Ann. NY Acad. Sci.* 899:326–334.
50. Masuda, T., Maekawa, T., Hidaka, K., Bando, H., Takeda, Y., and Yamaguchi, H. 2001. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcumin. Analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. *J. Agr. Food Chem.* 49:2539–2547.
51. Awasthi, S., Pandya, U., Singhal, S.S., Lin, J.T., Thiviyanathan, V., Seifert, W.E., Awasthi, Y.C., and Ansari, G.A. 2000. Curcumin-glutathione interactions and the role of human glutathione S-transferase P1-1. *Chem. Biol. Interact.* 128:19–38.
52. Dinkova-Kostova, A.T., and Talalay, P. 1999. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis.* 20:911–914.
53. Dinkova-Kostova, A.T., Massiah, M.A., Bozak, R.E., Hicks, R.J., and Talalay, P. 2001. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:3404–3409.
54. Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T.W. 2001. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:3410–3415.
55. Venkatesan, N. 1998. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *Br. J. Pharmacol.* 124:425–427.
56. Abe, Y., Hashimoto, S., and Horie, T. 1999. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol. Res.* 39:41–47.
57. Martin-Aragon, S., Benedi, J.M., and Villar, A.M. 1997. Modifications on antioxidant capacity and lipid peroxidation in mice under fraxetin treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* 49:49–52.
58. Sreejayan, Rao, M.N. 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 49:105–107.
59. Zhao, B.L., Li, X.J., He, R.G., Cheng, S.J., and Xin, W.J. 1989. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell. Biophys.* 14:175–185.
60. Flora, S.J. 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, 53:1-2.

- 61.** Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Weng, Y.H., Helston, R., Rish, K., Smith, A., Bordner, J., Polte, T., Gaunitz, F., Dennery, P.A. 2007. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J. Biol. Chem.* Epub ahead of print.
- 62.** Morimoto, R.I. 2006. Stress, aging, and neurodegenerative disease. *N. Engl. J. Med.* 355:2254-2255.
- 63.** Hawkins, C.L., Davies, M.J. 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504:196-219.
- 64.** Santoro, M.G. 2000. Heat shock and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.* 59:55-63.
- 65.** Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R., Calabrese, V., Clark, J. E. Green, C. J. 2000. Endothelial Heme oxygenase-1 induction by hypoxia: modulation by inducible nitric oxide synthase (iNOS) and S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* 275:13613-13620.
- 66.** Beak, S. H., Kim, J. Y., Choi, J. H., Park, E. M., Han, M. Y., Kim, C. H., Ahn, Y. S., Park, Y. M. 2000. Reduced glutathione oxidation ratio and 8-ohdg accumulation by mild ischemic pre-treatment. *Brain. Res.* 856:28-36.
- 67.** Wang, J.K., Kiyokawa, E., Verdin, E. and Trono, D. 2000. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:394-399.
- 68.** Calabrese, V., Copani, A., Testa, D., Ravagna, A., Spadaro, F., Tendi, E., Nicoletti, V.G., Giuffrida Stella, A.M. 2000. Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: effect on heat shock protein 70 synthesis and oxidant/antioxidant balance. *J. Neurosci. Res.* 60:613-622.
- 69.** Arnè E.S.J., Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267:6102-6109.
- 70.** Nakamura H. 2005. Thioredoxin and its related molecules: update 2005. *Antiox. Redox Signal.* 7:823-828.
- 71.** Das K.C. 2005. Thioredoxin and its role in premature newborn biology. *Antioxid. Redox Signal.* 7:1740-1743
- 72.** Cho C.G., Kim H.J., Chung S.W., Kyung K.J., Shim K.H., Yu B.P., Yodoi J., Chung H.Y. 2003. Modulation of glutathione and thioredoxin systems by calorie restriction during the aging process. *Exp. Gerontol.* 38:539-548.
- 73.** Sun Q.A., Kirnarsky L., Sherman S., Gladyshev V.N. 2001. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:3673-3678
- 74.** Rundolf A.K., Arnè E.S.J. 2004. Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antiox. Redox signal.* 6:41-52
- 75.** Hirota K., Nakamura H., Masutani H., Yodoi J. 2002. Thioredoxin Superfamily and Thioredoxin-Inducing Agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 957:189-199.

- 76.** Powis G., Mustacich D., Coon A. 2000. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Rad. Biol. Med.* 29:312-322.
- 77.** Klotz L.O., Sies H. 2003. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol. Lett.* 140-141:125-132.
- 78.** Venardos K., Harrison G., Headrick J., Perkins A. 2004. Effects of dietary selenium on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activity and recovery from cardiac ischemia reperfusion. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18:81-88.
- 79.** Watson W.H., Yang X., Choi Y.E., Jones D.P., Kehrer J.P. 2004. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicological Sciences* 78:3-14.
- 80.** Baker AF, Dragovich T, Tate WR, Ramanathan RK, Roe D, Hsu CH, Kirkpatrick DL, Powis G. 2006. The antitumor thioredoxin-1 inhibitor PX-12 (1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide) decreases thioredoxin-1 and VEGF levels in cancer patient plasma. *J Lab Clin Med* 147:83-90
- 81.** Nakamura H., Bai J, Nishinaka Y., Ueda S., Sasada T., Ohshio G., Imamura M., Takabayashi A., Yamaoka Y., Yodoi J. 2000. Expression of thioredoxin and glutaredoxin, redox-regulating proteins, in pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev* 24:53-60
- 82.** Trigona W.L., Mullarky I.K., Cao Y., Sordillo L.M. 2006. Thioredoxin reductase regulates the induction of heme oxygenase-1 expression in aortic endothelial cells. *J. Biochem.* 394:207-216
- 83.** Ryter S.W., Alam J., Choi A.M. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* 86:583-650.
- 84.** O'Dowd, J.J., Cairns, M.T., Trainor, M., Robins, D.J., and Miller, D.J. 1990. Analysis of carnosine, homocarnosine, and other histidyl derivatives in rat brain. *J. Neurochem.* 55:446-452.
- 85.** Bonfanti, L., Peretto, P., De Marchis, S. and Fasolo, S. 1999. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 59:333-353
- 86.** Hipkiss A.R., Preston J.E., Himsworth D.T., Worthington V.C., Keown M., Michaelis J., Lawrence J., Mateen A., Allende L., Eagle P.A., Abbott N.J. *Ann. NY Acad. Sci.* 1998, 854, 37.
- 87.** Hipkiss, A.R., Preston, J.E., Himsworth, D.T.M., Worthington, V.C., and Abbott, N.J. 1997. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 283:135-138.
- 88.** Boldyrev, A.A., Song, R., Dyatlov, V., Lawrence, D., and Carpenter, D. 1999. Carnosine protects against excitotoxic cell death independently of effects on reactive oxygen species. *Neuroscience.* 94:571-577.
- 89.** Stvolinsky, S.L., Kukley, M.L., Dobrota, D., Matejovicova, M., Tkac, I., and Boldyrev, A.A. 1999. Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19:45-56.

- 90.** Munch, G., Mayer, R., Michaelis, J., Hipkiss, A.R., Riederer, P., Muller, R., Neumann, A., Schinkel, R., and Cunningham, A.M. 1997. Influence of advanced glycation end-product and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymerization of beta-amyloid peptide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1360:17–29.
- 91.** Pubill, D., Verdaguer, E., Sureda, F.X., Camins, A., Pallas, M., Camarasa, J., and Escubedo, E. 2002. Carnosine prevents methamphetamine-induced gliosis but not dopamine terminal loss in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 448:165–168.
- 92.** Stvolinskii, S.L., Fedorova, T.N., Yuneva, M.O., and Boldyrev, A.A. 2003. Protective effect of carnosine on Cu,Zn superoxide dismutase during impaired oxidative metabolism in the brain in vivo. *Bull. Exp. Biol. Med.* 135:130–132.
- 93.** Hipkiss, A.R., Brownson, C., Bertani, M.F., Ruiz, E., and Ferro, A. 2002. Reaction of carnosine with aged proteins: another protective process?. *Ann. NY Acad. Sci.* 959:285–294.
- 94.** Hipkiss, A.R., Brownson, C., and Carrier, M.J. 2001. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech. Ageing Dev.* 122:1431–1445.
- 95.** Hyland, P., Duggan, O., Hipkiss, A., Barnett, C., and Barnett, Y. 2000. The effects of carnosine on oxidative DNA damage levels and in vitro lifespan in human peripheral blood derived CD4+T cell clones. *Mech. Ageing Dev.* 121:203–215.
- 96.** Halliwell, B. 2002. Hypothesis: proteasomal dysfunction: a primary event in neurodegeneration that leads to nitration and oxidative stress and subsequent cell death. *Ann. NY Acad. Sci.* 962:182–194.
- 97.** Hyun, D.H., Gray, D.A., Halliwell, B., and Jenner, P. 2004. Interference with ubiquitination causes oxidative damage and increased protein nitration: implications for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 90:422–430.
- 98.** Severina, S.I., Bussygina, O.G., and Pyatakova, N.V. 2000. Carnosine as a regulator of soluble guanylate cyclase. *Biochemistry (Moscow).* 65:921–927.
- 99.** Cacciatore I., Cocco A., Costa M., Fontana M., Lucente. G., Pecci L., and Pinnen, F. 2005. Biochemical properties of new synthetic carnosine analogues containing the residue of 2,3-diaminopropionic acid: the effect of N-acetylation. *Amino Acids.* 28:77–83.
- 100.** Fontana, M., Pinnen, F., Lucente, G., and Pecci, L. 2002. Prevention of peroxynitrite-dependent damage by carnosine and related sulphonamido pseudodipeptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 59:546–551.
- 101.** Reynolds, M.R., Berry, R.W., and Binder, L.I. 2005. Site-Specific Nitration and Oxidative Dityrosine Bridging of the tau Protein by Peroxynitrite: Implications for Alzheimer's Disease. *Biochemistry.* 44:1690–1700.

- 102.** Whiteman, M., and Halliwell B. 1997. Thiols and disulphides can aggravate peroxynitrite-dependent inactivation of alpha1-antiproteinase. *FEBS Lett.* 414:497–500.
- 103.** Westpal CH., Dipp MA., Guarente L. 2007. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? *Trends Biochem Sci* 32:555–560
- 104.** Salminen A., Ojala J., Huuskonen J., Kauppinen A., Suuronen T., Kaarniranta K. 2008 Interaction of aging-associated signalling cascades: inhibition of NF-kappaB signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cell Mol Life Sci* 65:1049–1058.
- 105.** Dali-Youcef N., Lagouge M., Froelich S., Koehl C., Schoonjans K., Auwerx J. 2007 Sirtuins: the ‘magnificent seven’, function, metabolism and longevity. *Ann Med* 39:335–345
- 106.** Perluigi M., Di Domenico F., Giorgi A., Schinina M.E., Coccia R., Cini C., Bellia F., Cambria M.T, Cornelius C., Butterfield D.A., and Calabrese V. 2010 Redox Proteomics in Aging Rat Brain: Involvement of Mitochondrial Reduced Glutathione Status and Mitochondrial Protein Oxidation in the Aging Process. *Journal of Neuroscience Research* 88:3498–3507.
- 107.** Compston A, Coles A. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet*;372:1502–17.
- 108.** Nessler S, Bruck W. 2010. Advances in multiple sclerosis research in 2009. *J Neurol*;257:1590–3.
- 109.** Derwenskus J. 2011. Current disease-modifying treatment of multiple sclerosis. *Mt Sinai J Med*;78:161–75.
- 110.** Kurtzke JF. 2008. Historical and clinical perspectives of the expanded disability status scale. *Neuroepidemiology.*; 31(1):1-9.
- 111.** Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Bella R, Foresti R, Bates TE, et al. 2002. Nitric oxide synthase is present in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis and is associated with increases in cerebrospinal fluid protein nitrotyrosine and S-nitrosothiols and with changes in glutathione levels. *J Neurosci Res*;70:580–7.
- 112.** Witherick J, Wilkins A, Scolding N, Kemp K. 2010. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Dis*;2011:164608.
- 113.** Ziemann U, Wahl M, Hattingen E, Tumani H. Development of biomarkers for multiple sclerosis as a neurodegenerative disorder. *Prog Neurobiol* 2011.
- 114.** Van Noort JM, van den Elsen PJ, van Horssen J, Geurts JJ, van der Valk P, Amor S. 2011. Preactive multiple sclerosis lesions offer novel clues for neuroprotective therapeutic strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets*;10:68–81.
- 115.** Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Bella R, Butterfield DA, Calvani M, et al. 2003. Disruption of thiol homeostasis and nitrosative stress in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis: evidence for a protective role of acetylcarnitine. *Neurochem*

Res;28:1321-8.

- 116.** Mattsson N, Yaong M, Rosengren L, Blennow K, Mattsson JE, Andersen O, et al. 2009. Elevated cerebrospinal fluid levels of prostaglandin E2 and 15-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in multiple sclerosis. *J Intern Med*;265:459-64.
- 117.** Mattsson N, Haghighi S, Andersen O, Yao Y, Rosengren L, Blennow K, et al. 2007. Elevated cerebrospinal fluid F2-isoprostane levels indicating oxidative stress in healthy siblings of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett*;414: 233-6.
- 118.** Calabrese V, Bella R, Testa D, Spadaro F, Scrofani A, Rizza V, et al. 1998. Increased cerebrospinal fluid and plasma levels of ultraweak chemiluminescence are associated with changes in the thiol pool and lipid-soluble fluorescence in multiple sclerosis: the pathogenic role of oxidative stress. *Drugs Exp Clin Res*;24:125-31.
- 119.** Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Calabrese EJ. 2009. Vitagenes, cellular stress response and acetylcarnitine: relevance to hormesis. *Biofactors*;35:146-60.
- 120.** Calabrese V, Cornelius C, Rizzarelli E, Owen JB, Dinkova-Kostova AT, Butterfield DA. 2009. Nitric oxide in cell survival: a Janus molecule. *Antioxid Redox Signal*;11:2717-39.
- 121.** Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Calabrese EJ, Mattson MP. Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:1763-811.
- 122.** Dinkova-Kostova A.T., Cory A.H., Bozak R.E., Hicks R.J., Cory J.G. 2007. Bis(2-hydroxybenzylidene)acetone, a potent inducer of the phase 2 response, causes apoptosis in mouse leukemia cells through a p53-independent, caspase-mediated pathway; *Cancer letters* vol.245,n 1-2,pp.341-349.
- 123.** Nakagawa-Yagi Y., Saito Y., Takada Y. e Takayama M. 1991. Carbachol enhances forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation via activation of calmodulin system in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Comm*; 178: 116-123.
- 124.** Seidenfaden R., Krauter A. e Hildebrandt H. 2006. The neural cell adhesion molecule NCAM regulates neuriteogenesis by multiple mechanisms of interaction. *Neurochem Int*; 49(1): 1-11
- 125.** Biedler J.L., Helson L. e Spengler B.A. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.*; 33: 2643-2652
- 126.** Olsson A.-K., Vadhammar K. e Nånberg. 2000. Activation and protein kinase C-dependent nuclear accumulation of ERK in differentiating human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res*; 256: 454-467.

- 127.** Jalava A.M., Heikkilä J., Åkerlind G., Pettitt G.R. e Åkerman K.E.O. 1990. Effects of bryostatins 1 and 2 on morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Cancer Res*; 50: 3422-3428.
- 128.** Biedler J.L., Roffler-Tarlov S., Schachner M. e Freedman L.S. 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*; 38: 3751-3757.
- 129.** Peterfreund R.A., Gies E.K. e Fink J.S. 1997. Protein kinase C regulates adenosine A2A receptor mRNA expression in SH-SY5Y cells. *Eur J Pharmacol*; 336: 71-80.
- 130.** Ammer H. e Schulz R. 1994. Retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is associated with changes in the abundance of G proteins. *J Neurochem*; 62: 1310-1318.
- 131. Ruffels et al, 2004**
- 132.** Ault D.T., Werling L.L. 2000. SH-SY5Y cells as a model for sigma receptor regulation of potassium-stimulated dopamine release. *Brain Res*; 877: 354-360.
- 133.** Canals M., Angulo E., Casadó V., Canela E.I., Mallol J., Viñals F., Staines W., Tinner B., Hillion J., Agnati L. Fuxe K., Ferré S., Lluís C., Franco R. 2005. Molecular mechanisms involved in the adenosine A1 and A2A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. *J Neurochem*; 92:337-348.
- 134.. Toll et all 1997**
- 135. Svensson, 2000**
- 136.** Ambrozaitis KV, Kontautas E, Spakauskas B, Vaitkaitis D. 2006. Pathophysiology of acute spinal cord injury. *Medicina (Kaunas Lithuania)*;42:255–61.
- 137.** Calabrese V, Cornelius C, Maiolino L, Luca M, Chiaramonte R, Toscano MA, et al. Oxidative stress, redox homeostasis and cellular stress response in Meniere's disease: role of vitagenes. *Neurochem Res* 2010;35(12):2208–17.
- 138.** Carlson GD, Gorden C. Current developments in spinal cord injury research. *Spine J* 2002;2:116–28.
- 139.** Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53:135–59.
- 140.** Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev* 2007;8:766–75.
- 141.** Calabrese EJ, Mattson MP, Calabrese V. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Hum Exp Toxicol* 2010;29(12): 980–1015.

- 142.** Genovese T, Mazzon E, Di Paola R, Crisafulli C, Muia C, Bramanti P, et al. 2006. Increased oxidative-related mechanisms in the spinal cord injury in old rats. *Neurosci Lett*;393:141–6.
- 143.** Kang JH. 2010. Protective effects of carnosine and homocarnosine on ferritin and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. *BMB Rep*;43(10):683–7.
- 144.** Corona C, Frazzini V, Silvestri E, Lattanzio R, La Sorda R, Piantelli M, et al. 2011. Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice. *PloS One*;6(3):e17971.
- 145.** Shen Y, He P, Fan YY, Zhang JX, Yan HJ, Hu WW, et al. 2010. Carnosine protects against permanent cerebral ischemia in histidine decarboxylase knockout mice by reducing glutamate excitotoxicity. *Free Radic Biol Med*;48(5):727–35.
- 146.** Calabrese V, Colombrita C, Guagliano E, Sapienza M, Ravagna A, Cardile V, et al. 2005. Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures. *Neurochem Res*;30:797–807.
- 147.** Fontana M, Pinnen F, Lucente G, Pecci L. 2002. Prevention of peroxynitrite-dependent damage by carnosine and related sulphonamido pseudodipeptides. *Cell Mol Life Sci*;59:546–51.
- 148.** Nicoletti VG, Santoro AM, Grasso G, Vagliasindi LI, Giuffrida ML, Cuppari C, et al. 2007. Carnosine interaction with nitric oxide and astroglial cell protection. *J Neurosci Res*;85:2239–45.
- 149.** Calabrese V, Cornelius C, Stella AM, Calabrese EJ. 2010. Cellular stress responses, mitostress and carnitine insufficiencies as critical determinants in aging and neurodegenerative disorders: role of hormesis and vitagenes. *Neurochem Res*;35(12):1880–915.
- 150.** Teufel M, Saudek V, Ledig JP, Bernhardt A, Boularand S, Carreau A, et al. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J Biol Chem* 2003;278:6521–31.
- 151.** Bellia F, Calabrese V, Guarino F, Cavallaro M, Cornelius C, De Pinto V, Rizzarelli E. 2009. Carnosinase levels in aging brain: redox state induction and cellular stress response. *Antioxid Redox Signal*;11:2759–75.
- 152.** Boldyrev A, Bulygina E, Leinsoo T, Petrushanko I, Tsubone S, Abe H. 2004. Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. *Comp Biochem Physiol*;137:81–8.
- 153.** Lanza V, Bellia F, D'Agata R, Grasso G, Rizzarelli E, Vecchio G. 2011. New glycoside derivatives of carnosine and analogs resistant to carnosinase hydrolysis: synthesis and characterization of their copper(II) complexes. *J Inorg Biochem*;105(2):181–8.
- 154.** Bellia F, Amorini AM, La Mendola D, Vecchio G, Tavazzi B, Giardina B, et al. 2008. New glycosidic derivatives of histidine-containing dipeptides



with antioxidant properties and resistant to carnosinase activity. *Eur J Med Chem*;43: 373–80.

**155.** Bertinaria M, Rolando B, Giorgis M, Montanaro G, Guglielmo S, Buonsanti MF, et al. 2011. Synthesis, physicochemical characterization, and biological activities of new carnosine derivatives stable in human serum as potential neuroprotective agents. *J Med Chem*;54(2):611–21.

**156.** Aldini G, Canevotti R, Negrisoli G. 2005. Compositions containing D-carnosine. Patent WO 2005/120543.

**157.** Colombrita C, Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Mattei F, Alkon DL, and Scapagnini G. 2003. Regional rat brain distribution of heme oxygenase-1 and manganese superoxide dismutase mRNA: relevance of redox homeostasis in the aging processes. *Exp Biol Med* 228: 517–524.

**158.** Scapagnini G, Foresti R, Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Green CJ, and Motterlini R. 2002. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol* 61: 554–561.

**159.** Scapagnini G, Butterfield DA, Colombrita C, Sultana R, Pascale A, Calabrese V. 2004. Ethyl ferulate, a lipophilic polyphenol, induces HO-1 and protects rat neurons against oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 6: 811–818..

**160.** Soti C and Csermely P. 2002. Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochem Int* 41: 383–389

**161.** Sultana R, Ravagna A, Mohammad-Abdul H, Calabrese V, and Butterfield DA. 2005. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide(1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *J Neurochem* 92: 749–758

**162.** McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*;50(1):121–7.

**163.** Lublin FD, Reingold SC. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisor Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*;46:907–11.

**164.** Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21:77-89.

**165.** Ross R.A., Spengler, B.A., Biedler, J.L. 1983. Coordinate morphological interconversion of human neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 71:741-747.

- 166.** Phlman, S., Hoehner, J.C., Nanberg, E., Hedborg, F., Fagerstrom, S., Gestblom, C., Johansson, I., Larsson, U., Lavenius, E., Ortoft, E. 1995. Differentiation and survival influences of growth factor in human neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* 31, 453-458.
- 167.** Encimas, M., Iglesias, M. Liu Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C. and com'ella J.X. 2000. Sequential treatment of SHSY5Y cellwith retinoic acid and brain derived neurotrophic factor –dependent, human neuron –like cells. *J. Neurochem.* 75, 991-1003
- 168.** Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F. H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- 169.** Adams, J. D., Lauterburg, B. H., Mitchell, J. R. 1983. Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227: 749-754.
- 170.** Sedlak J and Lindsay RH. 1968.Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25: 192–205,
- 171.** Lenney JF, George RP, Weiss AM, Kucera CM, Chan PW, and Rinzler GS. 1982. Human serum carnosinase: characterization,distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium. *Clin Chim Acta* 123: 221–231.
- 172.** Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63.
- 173.** Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E 1994. Carbonyl assays for determenation of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233: 346-57.
- 174.** Mignogna G, Giorgi A, Stefanelli P, Neri A, Colotti G, Maras B et al 2005. Inventory of the proteins in Neisseria meningitidis serogroup B strain MC58. *J Proteome Res* 4: 1361-70.
- 175.** Butterfield DA and Stadtman ER. 1997. Protein oxidation processes in aging brain. *Adv Cell Aging Gerontol* 2: 161–191.
- 176.** Butterfield, D.A. and Castegna, A. 2003. Proteomics for the identification of specifically oxidized proteins in brain: technology and application to the study of neurodegenerative disorders. *Amino Acids*; 25: 419-25.
- 177.** Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Panebianco M, Calafato S, Puleo E, et al. 2007. Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochem Res*;32:757–73.
- 178.**Calabrese V, Boyd-Kimball D, Scapagnini G, Butterfield DA. 2004. Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *In Vivo*;18:245–67.

- 179.** Mancuso C, Scapagnini G, Curro D, Giuffrida Stella AM, De Marco C, Butterfield DA, et al. 2007. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci*;12:1107–23.
- 180.** Lauderback CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szweda LI, Markesbery WR, et al. 2001. The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: role of A-beta 1-42. *J Neurochem*;78:413–6.
- 181** Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM. 1997. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tertbutylphenylnitron. *Proc Natl Acad Sci U S A*;94:674–8.
- 182.** Zhuoxiao, C., Seema H., Harry, Z. Q., Xingxian, P., Yunbo, L. 2004. Induction of endogenous glutathione by the chemoprotective agent, 3H-1,2-dithiole-3-thione, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells affords protection against peroxynitrite-induced cytotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316 1043–1049.
- 183.** Jaspreet, S., Gurcharan, K. 2005. Neuroprotection mediated by subtoxic dose of NMDA in SH-SY5Y neuroblastoma cultures: Activity-dependent regulation of PSA-NCAM expression. *Molecular Brain Research* 137 223 – 234.
- 184.** Encimas, M., Iglesias, M. Liu Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C. and com'ella J.X. 2000. Sequential treatment of SHSY5Y cell with retinoic acid and brain derived neurotrophic factor –dependent, human neuron –like cells. *J. Neurochem.* 75, 991-1003
- 185.** Calabrese, V., Butterfield, D.A., and Giuffrida Stella, A.M. 2003. Nutritional antioxidants and the heme oxygenase pathway of stress tolerance: novel targets for neuroprotection in Alzheimer's disease. *Ital. J. Biochem.* 52:177–181.
- 186.** Calabrese, V., Scapagnini, G., Ravagna, A., Colombrita, C., Spadaro, F., Butterfield, D.A., and Giuffrida Stella, A.M. 2004. Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. *Mech. Ageing Dev.* 125:325–335.
- 187.** Genova, M.L., Pich, M.M., Pernacchia, A., Bianchi, C., Biondi, A., Bovina, C., Falasca, A.I., Formaggini, G., Castelli, G.P., and Lenaz, G. 2004. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann. NY Acad. Sci.* 1011:86–100.
- 188.** Papa, S., and Skulachev V. P. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell. Biochem.* 174:305–319.

- 189.** Gonsette RE. 2008. Oxidative stress and excitotoxicity: a therapeutic issue in multiple sclerosis? *Mult Scler*;14:22-34.
- 190.** Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Ireneusz M. 2011. The level of isoprostanes as a non-invasive marker for in vivo lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurochem Res* ;36(6):1012-6.
- 191.** Genova, M.L., Pich, M.M., Biondi, A., Pernacchia, A., Falasca, A., Bovina, C., Formaggini, G., Parenti Castelli, G., and Lenaz, G. 2003. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. *Exp. Biol. Med.* 228:506–513.
- 192.** Ferri, P., Cecchini, T., Ciarloni, S., Ambrogini, P., Cuppini, R., Santi, S., Benedetti, S., Pagliarani, S., Del Grande, P., and Papa, S. 2003. Vitamin E affects cell death in adult rat dentate gyrus. *J. Neurocytol.* 32:1155–1164.
- 193.** Calabrese V, Butterfield DA, and Stella AM. 2008. Aging and oxidative stress response in the CNS. In: *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology*, edited by Lajtha A, Perez-Polo JR, Rossner S. New York: Springer, pp. 128–134.
- 194.** Navarro A and Boveris A. 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C670–C686.
- 195.** Jackson MC, Kucera CM, and Lenney JF. 1991. Purification and properties of human serum carnosinase. *Clin Chim Acta* 196:193–205.
- 196.** Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Barone E, Calafato S, Bates T, Rizzarelli E, and Kostova AT. 2009. Vitagenes, dietary antioxidants and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Front Biosci* 14: 376–397.
- 197.** Calabrese V, Mancuso C, Cornelius C, Calafato M, Ventimiglia B, Butterfield DA, Dinkova-Kostova AT, and Rizzarelli E. 2008. Reactive nitrogen species and cellular stress tolerance in aging and neurodegeneration: role of vitagenes. In: *Free radical pathophysiology*, edited by Alvarez S, Evelson P. Kerala, India: Transworld Research Network, pp. 345–367.
- 198.** Hamm-Alvarez S and Cadenas E. 2008. Mitochondrial medicine and mitochondrion-based therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1437–1438.
- 199.** Tew KD. 2007. Redox in redux: emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation. *Biochem Pharmacol* 73: 1257–1269.
- 200.** Mieyal JJ, Gallogly MM, Qanungo S, Sabens EA, and Shelton MD. 2008. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* 10: 1941–1988.
- 201.** Zeevalk GD, Razmpour R, and Bernard LP. 2008. Glutathione and Parkinson's disease: is this the elephant in the room? *Biomed Pharmacother* 62: 236–249.
- 202.** Calabrese V, Sultana R, Scapagnini G, Guagliano E, Sapienza M, Bella R, Kanski J, Pennisi G, Mancuso C, Stella AM, and Butterfield DA. 2006.

Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal* 8: 1975–1986.

**203.** De Leon MJ, George AE, Golomb J, Tarshish C, Convit A, Kluger A, De Santi S, McRae T, Ferris SH, Reisberg B, Ince C, Rusinek H, Bobinski M, Quinn B, Miller DC, and Wisniewski HM. 1997. Frequency of hippocampal formation atrophy in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 18: 1–11.

**204.** Navarro A and Boveris A. 2008. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1534–1544.

**205.** Killiany RJ, Moss MB, Albert MS, Sandor T, Tieman J, and Jolesz F. 1993. Temporal lobe regions on magnetic resonance imaging identify patients with early Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 50: 949–954.

**206.** Navarro A, Lopez-Cepero JM, Bandez MJ, Sanchez-Pino MJ, Gomez C, Cadenas E, and Boveris A. 2008. Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R501–R509.

**207.** Morimoto RI. 2008. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* 22: 1427–1438.

**208.** Lovell MA, Xie C, Gabbita SP, and Markesbery WR. 2000. Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Biol Med* 28: 418–427.

**209.** Tomobe K and Nomura Y. 2009. Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochem Res* 34: 660–669.

**210.** Nicoletti VG, Santoro AM, Grasso G, Vagliasindi LI, Giuffrida ML, Cuppari C, Purrello VS, Stella AM, and Rizzarelli E. 2007. Carnosine interaction with nitric oxide and astroglial cell protection. *J Neurosci Res* 85: 2239–2245.

**211.** Calabrese V, Colombrita C, Guagliano E, Sapienza M, Ravagna A, Cardile V, Scapagnini G, Santoro AM, Mangiameli A, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM, and Rizzarelli E. 2005. Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures. *Neurochem Res* 30: 797–807.

**212.** Fu Q, Dai H, Hu W, Fan Y, Shen Y, Zhang W, and Chen Z. 2008. Carnosine protects against Abeta42-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol* 28: 307–316.

**213.** Hipkiss AR. 2007. Could carnosine or related structures suppress Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 11: 229–240.

**214.** Balion CM, Benson C, Raina PS, Papaioannou A, Patterson C, and Ismaila AS. 2007. Brain type carnosinase in dementia: a pilot study. *BMC Neurol* 7: 38.

**215.** Amorini AM, Bellia F, Di Pietro V, Giardina B, La Mendola D, Lazzarino G, Sortino S, Tavazzi B, Rizzarelli E, and Vecchio G.

2007. Synthesis and antioxidant activity of new homocarnosine b-cyclodextrin conjugates. *Eur J Med Chem* 42: 910–920.
- 216.** Bellia F, Amorini AM, La Mendola D, Vecchio G, Tavazzi B, Giardina B, Di Pietro V, Lazzarino G, and Rizzarelli E. 2008. New glycosidic derivatives of histidine-containing dipeptides with antioxidant properties and resistant to carnosinase activity. *Eur J Med Chem* 43: 373–380.
- 217.** Rizzarelli E, Vecchio G, Lazzarino G, Amorini AM, and Bellia F. 2007. Trehalose conjugate with carnosine having antioxidant activity, stable to enzymic hydrolysis, procedure for its preparation, and pharmaceutical, cosmetic and nutraceutical compositions that contain it. EU Patent 1860116.
- 218.** Cini M, Moretti A. 1995. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging* 16:53–57.
- 219.** Dogru-Abbasoglu S, Tamer-Toptani S, Ugurnal B, Kocak-Toker N, Aykac-Toker G, Uysal M. 1997. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in livers and brains of aged rats. *Mech Ageing Dev* 98:177–180.
- 220.** Butterfield DA, Sultana R. 2008. Redox proteomics: understanding oxidative stress in the progression of age-related neurodegenerative disorders. *Expert Rev Proteom* 5:157–160.
- 221.** Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. 2000. Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mech Ageing Dev* 113:61–70.
- 222.** Butterfield DA, Kanski J. 2001. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech Ageing Dev* 122:945–962.
- 223.** Zhu Y, Carvey PM, Ling Z. 2006. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. *Brain Res* 1090:35–44.
- 224.** Calabrese V, Mancuso C, Ravagna A, Perluigi M, Cini C, De Marco C, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM. 2007. In vivo induction of heat shock proteins in the substantia nigra following L-DOPA administration is associated with increased activity of mitochondrial complex I and nitrosative stress in rats: regulation by glutathione redox state. *J Neurochem* 101:709–717.
- 225.** Calabrese V, Butterfield DA, Scapagnini G, Stella AM, Maines MD. 2006. Redox regulation of heat shock protein expression by signaling involving nitric oxide and carbon monoxide: relevance to brain aging, neurodegenerative disorders, and longevity. *Antiox Redox Signal* 8:444–477.
- 226.** Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Fariello RG, Giuffrida Stella AM, Abraham NG. 2002. Regional distribution of heme oxygenase, HSP70, and glutathione in brain: relevance for endogenous oxidant/ antioxidant balance and stress tolerance. *J Neurosci Res* 68:65–75.

- 227.** Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, Rozemuller JM, Baas F, Eikelenboom P, Scheper W. 2005. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 110:165–172.
- 228.** Perluigi M, Poon HF, Maragos W, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, Cini C, De Marco C, Butterfield DA. 2005. Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol Cell Proteom* 4:1849–1861.
- 229.** Pocernich CB, Poon HF, Boyd-Kimball D, Lynn BC, Nath A, Klein JB, Butterfield DA. 2005. Proteomic analysis of oxidatively modified proteins induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in human astrocytes expressing the HIV protein tat. *Brain Res Mol Brain Res* 133:299–306.
- 230.** Poon HF, Frasier M, Shreve N, Calabrese V, Wolozin B, Butterfield DA. 2005. Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P alpha-synuclein transgenic mice—a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 18:492–498.
- 231.** Poon HF, Hensley K, Thongboonkerd V, Merchant ML, Lynn BC, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, Butterfield DA. 2005. Redox proteomics analysis of oxidatively modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 39:453–462.
- 232.** Poon HF, Vaishnav RA, Butterfield DA, Getchell ML, Getchell TV. 2005. Proteomic identification of differentially expressed proteins in the aging murine olfactory system and transcriptional analysis of the associated genes. *J Neurochem* 94:380–392.
- 232.** Reed T, Perluigi M, Sultana R, Pierce WM, Klein JB, Turner DM, Coccia R, Markesbery WR, Butterfield DA. 2008. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 30:107–120.
- 233.** Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA. 2002. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med* 33:562–571.
- 234.** Sultana R, Newman SF, Abdul HM, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Merchant M, Butterfield DA. 2006. Protective effect of D609 against amyloid-beta1–42-induced oxidative modification of neuronal proteins: redox proteomics study. *J Neurosci Res* 84:409–417.
- 235.** Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB, Markesbery

- WR, Butterfield DA. 2006. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol Dis* 22:76–87.
- 236.** Yap LP, Garcia JV, Han D, Cadenas E. 2009. The energy-redox axis in aging and age-related neurodegeneration. *Adv Drug Deliv Rev*
- 237.** Mao P, Reddy PH. 2010. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim Biophys Acta*;1802:66-79.
- 238.** Frohman EM, Racke MK, Raine CS. 2006. Multiple sclerosis?the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*;354:942-55.
- 239.** Gonsette RE. 2008. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci*;274:48?53.
- 240.** Turturici G, Sconzo G, Geraci F. 2011. Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochem Res Int*;2011:618127.
- 241.** Choi IY, Lee SP, Denney DR, Lynch SG. 2011. Lower levels of glutathione in the brains of secondary progressive multiple sclerosis patients measured by 1H magnetic resonance chemical shift imaging at 3 T. *Mult Scler*;17:289-96
- 242.** Liu Y, Liu J, Tetzlaff W, Paty DW, Cynader MS. 2006. Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Free Radic Biol Med*;40:960-7.
- 243.** Leung G, Sun W, Zheng L, Brookes S, Tully M, Shi R. 2011. Anti-acrolein treatment improves behavioral outcome and alleviates myelin damage in experimental autoimmune encephalomyelitis mouse. *Neuroscience* ;173:150-5
- 244.** Esposito E, Cuzzocrea S. 2010. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol*;8(September (3)):228-42
- 245.** Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Backstrom BT, Tordsson J, Holmdahl R. 2004. Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*;101:12646-51
- 246.** Lindsey JW, Agarwal SK, Tan FK. 2011. Gene expression changes in multiple sclerosis relapse suggest activation of T and non-T cells. *Mol Med*;17:95-102
- 247.** Dello Russo C, Polak PE, Mercado PR, Spagnolo A, Sharp A, Murphy P, et al. 2006. The heat-shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin suppresses glial inflammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem*;99:1351-62



- 248.** Saha RN, Pahan K. 2006. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal*;8:929-47
- 249.** Bolaños JP, Heales SJ. 2010. Persistent mitochondrial damage by nitric oxide and its derivatives: neuropathological implications. *Front Neuroenergetics*;2 (February):1
- 250.** Gibbs PE, Maines MD. 2007. Biliverdin inhibits activation of NF-kappaB: reversal of inhibition by human biliverdin reductase. *Int J Cancer* ;121:2567-74
- 251.** Maines MD. 2004. The heme oxygenase system: past, present, and future. *Antioxid Redox Signal*;6:797-801.
- 252.** Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark JE, Green CJ. 2000. Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitricoxide synthase and S-nitrosothiols. *J Biol Chem* ;275:13613-20
- 253.** Calabrese V, Scapagnini G, Colombrita C, Ravagna A, Pennisi G, Giuffrida Stella AM, et al. 2003. Redox regulation of heat shock protein expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: a nutritional approach. *Amino Acids*;25:437-44.
- 254.** Cid C, Alcazar A. 2010. Protection of oligodendrocyte precursor cells by low doses of HSP90 inhibitors in cell culture. *Exp Neurol* ;225:29-33
- 255.** Mha' ille AN, McQuaid S, Windebank A, Cunnea P, McMahan J, Samali A, et al. 2008. Increased expression of endoplasmic reticulum stress-related signaling pathway molecules in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*;67:200-11.
- 256.** Stahnke T, Stadelmann C, Netzler A, Brück W, Richter-Landsberg C. 2007. Differential upregulation of heme oxygenase-1 (HSP32) in glial cells after oxidative stress and in demyelinating disorders. *J Mol Neurosci*;32: 25-37.
- 257.** Mancuso C, Scapagnini G, Curro D, Giuffrida Stella AM, De Marco C, Butterfield DA, et al 2007. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci*;12:1107-23
- 258.** Bender T, Lewrenz I, Franken S, Baitzel C, Voos W. 2011. Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. *Mol Biol Cell*;22(March (5):541-54.
- 259.** Herranz D, Serrano M. 2010. SIRT1: recent lessons from mouse models. *Nat Rev Cancer*;10:819-23

- 260.** Mandal PK, Seiler A, Perisic T, Košćić P, Banjac Canak A, Forster H, et al. 2010. System x(c)- and thioredoxin reductase 1 cooperatively rescue glutathione deficiency. *J Biol Chem*;285:22244-53.
- 261.** De Andres, C., Lledo, A. 1997. Fatty diet and multiple sclerosis. *Rev. Neurol.* 25: 2032-2035.
- 262.** Bizzozero OA, Dejesus G, Callahan K, Pastuszyn A. 2005 Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *J Neurosci Res*.
- 263.** Newcombe, J., Li, H., Cuzner, M.L. 1994. Low density lipoprotein uptake by macrophages in multiple sclerosis plaques: implications for pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 20:152-62.
- 264.** Szeinberg, A., Golan, R., Ben-Ezzer, J., Sarova-Pinhas, I., Kindler, D. 1981. Glutathione peroxidase activity in various types of blood cells in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 63: 67-75.
- 265.** Calabrese, V., Raffaele, R., Casentino, E., Rizza, V. 1994. Changes in cerebrospinal fluid levels of malondialdehyde and glutathione reductase activity in multiple sclerosis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 14: 119-123.
- 266.** Calabrese, V., Bella, R., Testa, D., Spadaro, F., Scrofani, A., Rizza, V., Pennisi, G. 1998. Increased cerebrospinal fluid and plasma levels of ultraweak chemiluminescence are associated with changes in the thiol pool and lipid-soluble fluorescence in multiple sclerosis: the pathogenic role of oxidative stress. *Drugs Exp. Clin. Res.* 24: 125-131.
- 267.** Cwiklinska, H., Mycko, M. P., Luvsannorov, O., Walkowiak, B., Brosnan, C. F., Raine, C. S., Selmaj, K. W. 2003. Heat shock protein 70 associations with myelin basic protein and proteolipid protein in multiple sclerosis brains. *Immunol.* 15: 241-9.
- 268.** Businaro, R., Fabrizi, C., Caronti, B., Calderaro, C., Fumagalli, L., Lauro, G. M. 2002. Myelin basic protein induces heme oxygenase-1 in human astroglial cells. *Glia.* 37: 83-8.
- 269.** Aquino, D.A., Capello, E., Weisstein, J., Sanders, V., Lopez, C., Tourtellotte, W.W., Brosnan, C.F., Raine, C.S., Norton, W.T. 1997. Multiple sclerosis: altered expression of 70- and 27-kDa heat shock proteins in lesions and myelin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56: 664-672.
- 270.** Rithidech KN., Honikel L., Milazzo M., Madigan D., Troxell R. and Krupp L.B. 2009. Protein expression profile in pediatric multiple sclerosis: potential biomarkers. *Multiple Sclerosis.* 15: 455-464.
- 271.** Fagan, A. M., Christopher, E., Taylor, J. W., Parsadanian, M., et al. 2004. ApoAI deficiency results in marked reductions in plasma cholesterol but no alterations in amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease-like cerebral amyloidosis. *Am J Pathol.* 165, 1413-1422.
- 272.** Plump, A. S., Azrolan, N., Odaka, H., Wu, L., et al. 1997. ApoA-I knockout mice: characterization of HDL metabolism in homozygotes and

identification of a post-RNA mechanism of apoA-I up-regulation in heterozygotes. *J Lipid Res.* 38, 1033-1047.

**273.** Williamson, R., Lee, D., Hagaman, J., Maeda, N. 1992. Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 7134-7138.

**274.** Helbecque, N., Codron, V., Cotel, D., Amouyel, P. 2008. An apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism associated with cognitive decline, but not with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 25, 97-102.

**275.** Dumont, D, Noben, JP, Raus, J, Stinissen, P, Robben, J. 2004. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Proteomics.* 4: 2117–2124.

**276.** Hammack, BN, Fung, KY, Hunsucker, SW, et al. 2004. Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 10: 245–260.

**277.** Lehmsiek, V, Sussmuth, SD, Tauscher, G, et al. 2007. Cerebrospinal fluid proteome profile in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 13: 840–849.

**278.** OConnor, KC, Roy, SM, Becker, CH, Hafler, DA, Kantor, AB. 2006. Comprehensive phenotyping in multiple sclerosis: discovery based proteomics and the current understanding of putative biomarkers. *Dis Markers.* 22: 213–225.

**279.** N.J. Gutowski J.M., Pinkham D., Akanmu S., Chirico and R.P. Murphy. 1998. Free radicals in inflammatory neurological disease: increased lipid peroxidation and haptoglobin levels in Guillain Barre syndrome, *Ir J Med Sci* 167(1) 43–46.

**280.** Calabrese, V., Scapagnini, G., Ravagna, A., Giuffrida Stella, A.M., and Butterfield, D.A. 2002. Molecular chaperones and their roles in neural cell differentiation. *Dev. Neurosci.* 24:1–13.

**281.** Kravets, A., Hu, Z., Miralem, T., Torno, M.D. and Maines, M.D. 2004. Biliverdin reductase, a novel regulator for induction of activating transcription factor-2 and heme oxygenase-1. *J. Biol. Chem.* 279:19916–19923.

**282.** Mosser, D.D., and Morimoto R.I. 2004. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene.* 23:2907–2918.

**283.** Maines, M.D. 2002. Hemeoxygenase transgenic mice as a model to study neuroprotection. *Method Enzymol.* 353:374–388.

**284.** Nguyen, T., Yang, C.S., and Pickett, C.B. 2004. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic. Biol. Med.* 37:433–441.

**285.** Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C.J., Foresti, R., Alam, J., and Motterlini, R. 2003. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J.* 371:887–895.

**286.** Alam, J. 2002. Heme oxygenase-1: past, present, and future. *Antioxid. Redox Signal.* 4:559–562.

- 287.** Boldyrev, A., Bulygina, E., Leinsoo, T., Petrushanko, I., Tsubone, S., and Abe, H. 2004. Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 137:81–88.
- 288.** Miyamae, M., Diamond, I., Weiner, M.W., Camacho, S.A., and Figueredo, V.M. 1997. Regular alcohol consumption mimics cardiac preconditioning by protecting against ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:3235–3239.
- 289.** Izaki K, Kinouchi H, Watanabe K, Owada Y, Okubo A, Itoh H, Kondo H, Tashima Y, Tamura S, Yoshimoto T and Mizoi K. 2001. Induction of mitochondrial heat shock protein 60 and 10 mRNAs following transient focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 88:14-25.
- 290.** Kubo A, Kinouchi H, Owada Y, Kunizuka H, Itoh H, Izaki K, Kondo H, Tashima Y, Yoshimoto T, and Mizoi K. 2000. Simultaneous induction of mitochondrial heat shock protein mRNAs in rat forebrain ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 84:127-134.
- 291.** Stewart VC, Heslegrave AJ, Brown GC, Clark JB, and Heales SJ. 2002. Nitric oxide-dependent damage to neuronal mitochondrial involves the NMDA receptor. *Eur J Neurosci.* 15:458-464
- 292.** Xu J, Kim GM, Chen S, Yan P, Ahmed SH, Ku G, et al. 2001. iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury. *J Neurotrauma;* 18:523–32.
- 293.** Beckman JS. 1996. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol;* 9:836–44.
- 294.** Hobart LJ, Seibel I, Yeargans GS, Seidler NW. 2004. Anti-crosslinking properties of carnosine: significance of histidine. *Life Sci;* 75:1379–89.
- 295.** Chez MG, Buchanan CP, Aimonovitch MC, Becker M, Schaefer K, Black C, et al. 2002. Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *J Child Neurol;* 17:833–7.
- 296.** Stvolinsky SL, Kukley ML, Dobrota D, Matejovicova M, Tkac I, Boldyrev AA. 1999. Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cell Mol Neurobiol;* 19:45–56.
- 297.** Kang JH, Kim KS. 2003. Enhanced oligomerization of the alpha-synuclein mutant by the Cu,Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system. *Mol Cells;* 15:87–93.
- 298.** Thiel R, Fowkes SW. 2005. Can cognitive deterioration associated with Down syndrome be reduced? *Med Hypotheses;* 64:524–32.

- 299.** Petroff OA, Hyder F, Rothman DL, Mattson RH. 2001. Homocarnosine and seizure control in juvenile myoclonic epilepsy and complex partial seizures. *Neurology*;56:709–15.
- 300.** Ferrari CK. 2004. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*;5:275–89.
- 301.** Gallant S, Kukley M, Stvolinsky S, Bulygina E, Boldyrev A. 2000. Effect of carnosine on rats under experimental brain ischemia. *Tohoku J Exp Med*;191:85–99.

