

**HIGHLIGHTS**

**IL RUOLO  
DELL'INTEGRAZIONE NUTRIZIONALE  
NEL SOGGETTO ANZIANO**

**Milano, 21 Giugno 2000**

FONDAZIONE  
GIOVANNI LORENZINI  
MILAN, ITALY



GIOVANNI LORENZINI  
MEDICAL FOUNDATION  
HOUSTON, USA

## **EDITORE**



Fondazione Giovanni Lorenzini  
Medical Science Foundation  
Via A. Appiani, 7  
20121 Milano

Tel.: 02/29006267  
Fax: 02/29007018  
E-mail: [lorenzfo@icil64.cilea.it](mailto:lorenzfo@icil64.cilea.it)

## **AVVERTENZE**

È vietata la riproduzione anche parziale, con qualsiasi mezzo, senza preventiva autorizzazione scritta dell'Editore.

Nonostante sia stata posta grande cura nella elaborazione di questo testo al fine di assicurare un contenuto scientifico il più accurato ed aggiornato possibile, l'editore non può essere ritenuto responsabile per eventuali errori, omissioni o inesattezze, dovuti al rapido sviluppo della scienza medica.

Prezzo per copia Lit. 1.500

(IVA condensata nel prezzo di vendita e assolta dall'Editore ai sensi dell'art. 74, primo comma, lettera c, del D.P.R. 633/1972 e D.M. 29.12.1989)

# HIGHLIGHTS

---

*Questa pubblicazione è basata sul Simposio "IL RUOLO DELL'INTEGRAZIONE NUTRIZIONALE NEL SOGGETTO ANZIANO" tenutosi a Milano il 21 Giugno 2000.*

Relatori che hanno partecipato al Simposio:

**Gaetano Crepaldi**

Direttore Clinica Medica 1<sup>a</sup>  
Dipartimento di Scienze Mediche Chirurgiche  
Università degli Studi  
Padova

**Amleto D'Amicis**

Direttore Unità di Statistica ed  
Economia dell'Alimentazione  
Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione  
Roma

**Claudio Galli**

Cattedra di Saggi e Dosaggi Farmacologici  
Istituto di Scienze Farmacologiche  
Università degli Studi  
Milano

**Stefano Govoni**

Direttore Dipartimento di Farmacologia Sperimentale e Applicata  
Facoltà di Farmacia  
Università degli Studi  
Pavia

**Rodolfo Paoletti**

Direttore Istituto di Scienze Farmacologiche  
Università degli Studi  
Milano

**Giancarlo Pepeu**

Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica M. Aiazzi-Mancini  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Università degli Studi  
Firenze

**Andrea Poli**

Istituto di Scienze Farmacologiche  
Università degli Studi  
Milano

**Piero Ruggeri**

Dipartimento di Medicina Sperimentale  
Sezione di Fisiologia Umana  
Università degli Studi  
Genova

Coordinatore della pubblicazione:

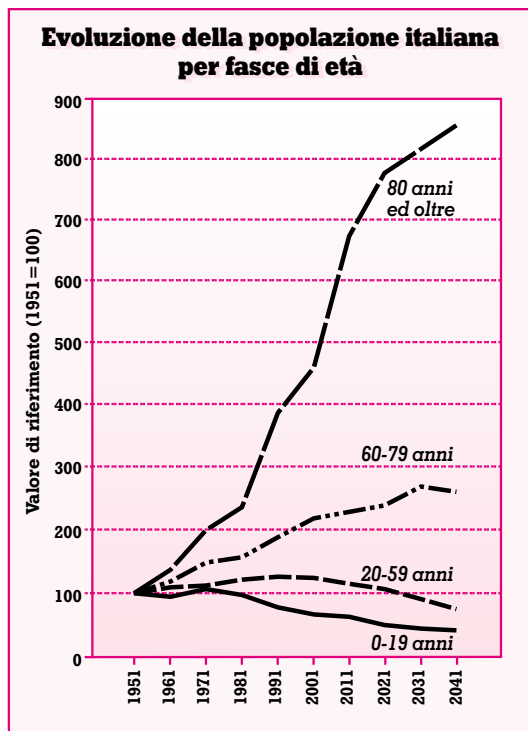
**Andrea Poli** (*Istituto di Scienze Farmacologiche - Università di Milano*)

# Introduzione

Rodolfo Paoletti (Università di Milano)

La distribuzione per età della popolazione in Italia è cambiata in modo marcato negli ultimi 50 anni, con un aumento dei soggetti in età avanzata che è consistente sia in termini relativi che assoluti.

L'aumento, particolarmente evidente per il segmento di soggetti oltre gli 80 anni di età (figura 1), si spiega in larga parte con il progressivo allungamento della vita media nel nostro Paese; la speranza di vita degli italiani ha infatti ormai raggiunto valori (oltre 75 anni per gli uomini ed oltre 81 per le donne) che la pongono ai vertici delle classifiche mondiali sia per gli individui di sesso maschile che di sesso femminile.



(Figura 1)

L'aumento della speranza di vita, che sottolinea le valenze positive dello stile di vita della nostra popolazione, e della qualità globale dell'assistenza sanitaria nel nostro Paese, pone al tempo stesso una serie di problemi di carattere sociale, sanitario ed economico di non semplice soluzione.

I soggetti in età avanzata, innanzitutto, sono in larga parte trattati cronicamente con farmaci, e spesso con un elevato numero di differenti principi farmacologici. L'ulteriore arricchimento della terapia di questi soggetti con altri farmaci mirati alla prevenzione degli eventi cardiovascolari, del decadimento cerebrale senile e delle altre patologie degenerative frequenti in questa fascia di età, che sono nel loro complesso le principali cause di

invalidità e di morte del soggetto anziano, porrebbe quindi ovvii problemi di compliance, di possibili interazioni farmacologiche, di tollerabilità, di costi.

Un approccio alternativo a questi temi può essere basato su un uso razionale di integratori alimentari di documentata efficacia. Le azioni preventive, e talora terapeutiche, di alcune di queste sostanze sono state esaminate in modo approfondito durante il Simposio "IL RUOLO DELL'INTEGRAZIONE NUTRIZIONALE NEL SOGGETTO ANZIANO", organizzato a Milano il 21 Giugno 2000 dalla Fondazione Giovanni Lorenzini. I relatori intervenuti hanno sottolineato le valenze cliniche dell'uso di integratori contenenti antiossidanti, alcune vitamine, Creatina, Fosfatidilserina, selezionando, da propri lavori originali o dalla ricca letteratura esistente, le informazioni più pertinenti all'uso di queste molecole nel soggetto anziano.

Questo fascicolo, che presenta un'ampia sintesi delle relazioni presentate nel Simposio, potrà essere utile al medico per aumentare le proprie capacità di gestire in modo articolato e soddisfacente la salute dei pazienti in età avanzata, che a buon diritto attendono dalla scienza medica un aiuto sempre più mirato al raggiungimento di una vita di elevata qualità.

# Lo stato nutrizionale dell'anziano in Italia

Amleto D'Amicis (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione - Roma)

La distribuzione dell'età nella popolazione italiana si sta modificando con rapidità, a causa della progressiva riduzione della mortalità (e del conseguente allungamento della vita media) e della contemporanea riduzione della natalità. Circa il 15% della nostra popolazione, di conseguenza, ha ormai più di 65 anni di età, e tale percentuale è destinata a salire nelle prossime decadi. La stessa popolazione presenta, da un punto di vista comportamentale, un basso livello di attività motoria. Due terzi della popolazione italiana, infatti, dichiarano di essere totalmente inattivi sul piano fisico.

Come conseguenza dell'effetto combinato di questi due fenomeni (l'invecchiamento della popolazione e la bassa attività fisica media) il fabbisogno calorico medio della popolazione italiana si è ridotto in maniera significativa negli ultimi 40 anni, passando da 2.550 Kcal nel 1961 a 2.300 Kcal nel 1981, e rimanendo poi approssimativamente costante a partire da tale anno.

A fronte di questo fabbisogno, secondo dati dell'Istituto Nazionale della Nutrizione (oggi Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, o INRAN), l'apporto calorico totale medio nel nostro Paese era nel 1995 di 2.162 Kcal, adeguato quindi ai livelli di consumo energetico di una popolazione a scarsa attività fisica, mentre solo dieci anni prima, nel 1984, esso era di 2.700 Kcal, pari al 112% del fabbisogno calcolato in tale periodo.

Sembra esistere quindi un sostanziale equilibrio, a livello di apporti calorici e di dispendi energetici medi, nella nostra popolazione: ciò nonostante, circa la metà dei soggetti di sesso maschile, ed un terzo dei soggetti di sesso femminile, è attualmente sovrappeso od obeso; gli obesi in senso stretto sono il 7% della popolazione.

La quota di soggetti in sovrappeso cresce al crescere dell'età, iniziando ad essere significativa verso i 35 anni ed aumentando in modo marcato oltre i 50 anni. Anche i casi di sottopeso, talora grave, sono peraltro in aumento nel nostro Paese, specie nella popolazione femminile e nei soggetti in età adolescenziale o molto avanzata.

Nel 1995 l'INRAN ha esaminato con maggiore dettaglio, su un campione di circa 3.000 soggetti rappresentativi della nostra popolazione nazionale, l'apporto dei principali gruppi di nutrienti, di vitamine e minerali.

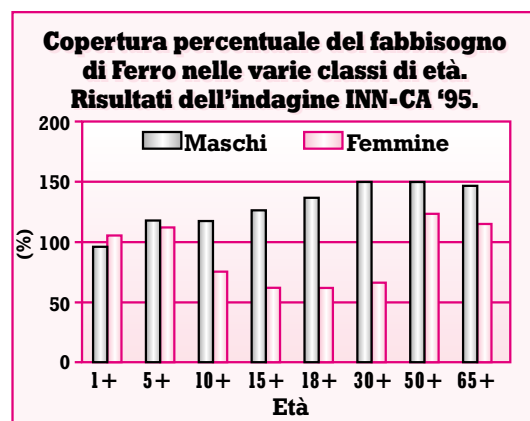
Su un piano generale si osserva che la maggior parte dei nutrienti stessi è consumata in eccesso (le proteine del 50% circa, i lipidi ed i grassi saturi del 20%), mentre l'apporto di amidi è sensibilmente inferiore a quello raccomandato (-20%); si osser-

serva invece un eccesso, della stessa ampiezza, del consumo di zuccheri semplici.

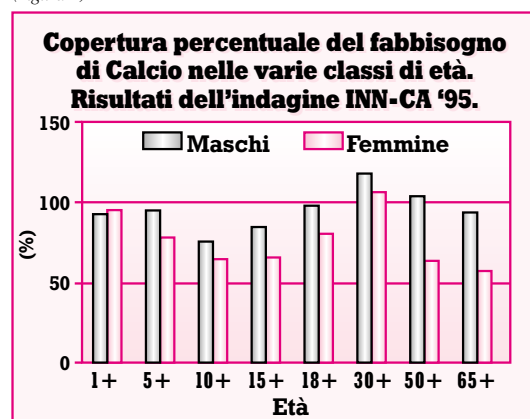
Tra le vitamine, è marcatamente deficitario l'apporto della D (che è pari a circa la metà del raccomandato), mentre le altre vitamine, mediamente, sono attorno ai valori di assunzione suggeriti. Tra i minerali, si osserva un deficit significativo della copertura media del fabbisogno di Calcio, mentre l'apporto degli altri minerali, sempre mediamente, è adeguato.

La situazione, tuttavia, si modifica in modo apprezzabile se si passa ad esaminare con maggiore dettaglio la copertura del fabbisogno dei differenti nutrienti nelle varie fasi della vita.

Nelle donne, per esempio, la copertura del fabbisogno di Ferro è insufficiente a partire dall'età di 10 anni e fino ai 50 anni, mentre nel sesso maschile essa appare adeguata (figura 2). Il fabbisogno di Calcio è coperto in modo incompleto, specie tra i soggetti di sesso femminile, nei quali l'apporto stesso è largamente deficitario dai 5 ai 30 anni (il periodo nel quale si forma la maggior parte della massa ossea) e torna ad essere insufficiente dopo la menopausa, durante la quale il fabbisogno aumenta nuovamente per antagonizzare i fenomeni di decadimento osseo (figura 3).



(Figura 2)



(Figura 3)

## Lo stato nutrizionale dell'anziano in Italia

Questa situazione riflette soprattutto il basso apporto di latte a partire da un'età di circa 5 anni, fino ad oltre 65, che è solo parzialmente compensato dal consumo di formaggi, che ha un andamento approssimativamente speculare a quello del latte. Nei soggetti di età avanzata, in particolare, l'apporto calcico è particolarmente compromesso. Tra le donne, esso è in media compreso tra il 45% del fabbisogno suggerito, secondo studi della Ferro Luzzi, ed il 65% del fabbisogno stesso, secondo dati più recenti di altri ricercatori dell'INRAN; nel sesso maschile esso oscilla invece tra il 70% ed il 90% del fabbisogno suggerito.

Oltre gli 80 anni di età, la situazione si deteriora ulteriormente. L'apporto alimentare di Calcio, in questa fascia di età, si riduce infatti sensibilmente, ed in ambedue i sessi, rispetto a quello osservato tra individui di età compresa tra 60 e 69 anni (-17% tra gli uomini e -7% tra le donne).

Lo studio della sideremia mostra, nei soggetti in età geriatrica, una situazione carenziale in circa il 10% dei soggetti di ambo i sessi. Per quanto concerne l'apporto vitaminico, che come si ricorderà era mediamente soddisfatto, con l'eccezione della vitamina D, nella popolazione nazionale, la situazione si modifica sfavorevolmente, ancora una volta, passando a considerare i soggetti in età geriatrica. In questo gruppo di età, infatti, il rilievo di situazioni di carenza marginale è tutt'altro che raro. La frequenza di queste situazioni va dal 3% circa per la vitamina E al 20-25% per le vitamine B1 e B2; il riscontro di carenze marginali di vitamina C e di folati si attesta attorno al 15% dei casi (figura 4).

Carenze marginali di vitamine in Italia tra la popolazione anziana	
Vitamine	Soggetti con carenza (%)
○ Retinolo	6
○ Tocoferolo	3
○ Vitamina B1	25
○ Vitamina B2	20
○ Vitamina C	14
○ Acido Folico	15

(Figura 4)

Per quanto concerne i folati, studi condotti con altre metodologie suggeriscono che la frequenza di situazioni di deficit possa essere anche maggiore. I dati del recente studio SENECA, che hanno raffrontato l'apporto alimentare di vari nutrienti in numerose popolazioni, tra cui quella italiana, negli anni '80 e nel '99, mostrano che i trend di evoluzione più recenti di questi parametri non sono favorevoli.

Nei soggetti di sesso maschile, si è ulteriormente ridotto l'apporto di Calcio e di numerose vitamine; tra le donne, più specificamente, si è ridotto l'apporto di vitamina B6, B2, di Calcio e di Ferro. La quota di soggetti con deficit marginali dell'apporto di questi nutrienti non energetici, pertanto, è aumentata in modo importante, e per alcune vitamine è di fatto raddoppiata.

Pur in un contesto nazionale di discreto equilibrio tra esigenze ed apporto alimentare, la popolazione anziana suggerisce pertanto più di un motivo di preoccupazione. In questa fascia di età l'apporto di numerosi nutrienti non energetici (soprattutto vitamine e minerali) è infatti deficitaria. Questa osservazione è probabilmente spiegata dal tipo di dieta frequentemente adottata dal soggetto anziano, che tende ad essere monotona, povera in prodotti freschi, e specie in vegetali e frutta, sia per motivi di carattere pratico (limitata conservabilità, esigenza di prepararli per il consumo, limitata fruibilità da parte dei soggetti con problemi alla masticazione), sia per motivi più generali (costo talora elevato, tendenza a mangiare in solitudine, e quindi in fretta, privilegiando cibi già pronti). Nei soggetti anziani, pertanto, vi è spazio teorico per integrazioni mirate, che compensino queste situazioni di deficit e facilitino così il mantenimento nel tempo di un adeguato stato di salute e benessere.

- ◆ Una ricerca dell'INRAN del 1995 mostra che la popolazione italiana consuma in eccesso, mediamente, la maggior parte dei nutrienti (le proteine del 50% circa, i lipidi ed i grassi saturi del 20%); l'apporto di amidi è invece sensibilmente inferiore a quello raccomandato (-20%).
- ◆ Sono marcatamente deficitari l'apporto della vitamina D e del Calcio; per le altre vitamine e gli altri minerali, invece, i consumi medi sono attorno ai valori suggeriti.
- ◆ Nelle donne, tuttavia, la copertura del fabbisogno di Ferro è insufficiente tra i 10 ed i 50 anni, e quello del Calcio dai 5 ai 30 anni e dopo la menopausa. Oltre gli 80 anni di età, l'apporto alimentare di Calcio si riduce ulteriormente in ambedue i sessi.
- ◆ Tra i soggetti in età geriatrica il rilievo di situazioni di carenza vitaminica marginale è molto frequente, osservandosi nel 3% dei casi per la vitamina E, nel 15% per la vitamina C ed i folati, e nel 20-25% per le vitamine B1 e B2.

# Creatina: il ruolo nella funzionalità muscolare

Piero Ruggeri (Università di Genova)

**N**el corso dell'invecchiamento il muscolo scheletrico subisce considerevoli modificazioni sia strutturali che funzionali. Le alterazioni età-correlate a carico della muscolatura scheletrica sono rappresentate da un lato da riduzione della massa e della sezione trasversa dei muscoli e dall'altro da variazioni del metabolismo energetico muscolare.

Per quanto riguarda la riduzione della massa muscolare numerosi studi dimostrano che nel soggetto anziano essa è in media nell'ordine del 25-35%, a livello degli arti, rispetto a soggetti giovani, con un significativo incremento del contenuto muscolare di tessuto adiposo e connettivo.

Confrontando sezioni muscolari di soggetti di età crescente, si osserva come sia la sezione muscolare globale sia il numero delle fibre, per unità di volume di tessuto, tendano a ridursi. Le principali variazioni strutturali riguardano le fibre di tipo II a scossa rapida, che nell'anziano presentano una riduzione sia del numero che delle dimensioni, mentre assai meno colpite nel corso dell'invecchiamento risultano essere le fibre di tipo I a scossa lenta. Nell'anziano si riscontrano anche alterazioni a carico del metabolismo energetico del muscolo scheletrico, con riduzione dell'attività enzimatica specifica dei principali circuiti metabolici, ed in particolare a carico degli enzimi ossidativi, la cui attività appare ridotta del 15-30% nei muscoli di soggetti anziani sani, ma sedentari, rispetto a quella di soggetti giovani. Studi condotti *in vitro* hanno parallelamente evidenziato che nel soggetto anziano la capacità del tessuto muscolare di utilizzare ossigeno è ridotta del 25-50%. Pertanto, la risposta metabolica all'esercizio fisico appare alterata nel muscolo scheletrico del soggetto anziano, con conseguente danno a carico della funzione muscolare. Anche il sistema Creatina/Creatina-fosfato appare interessato alle modificazioni metaboliche riscontrate nel muscolo dell'anziano. Appare, quindi, interessante approfondire il ruolo fisiologico giocato da tale sistema nell'ambito dell'attività muscolare, per poter poi analizzare le alterazioni che colpiscono tale circuito nel corso dell'invecchiamento.

E' forse utile, a questo proposito, sottolineare alcuni aspetti storici relativi alla storia della Creatina, ed alla progressiva acquisizione delle informazioni sulla funzione di questa sostanza nella cellula muscolare.

Scoperta nel 1832 dallo scienziato francese Chevreul, che la chiamò Creatina (dal greco "creas", o carne), per la sua ricca presenza nel tessuto muscolare, la Creatina fu associata all'attività contrattile del muscolo stesso in considerazione della sua diversa concentrazione nel muscolo degli ani-

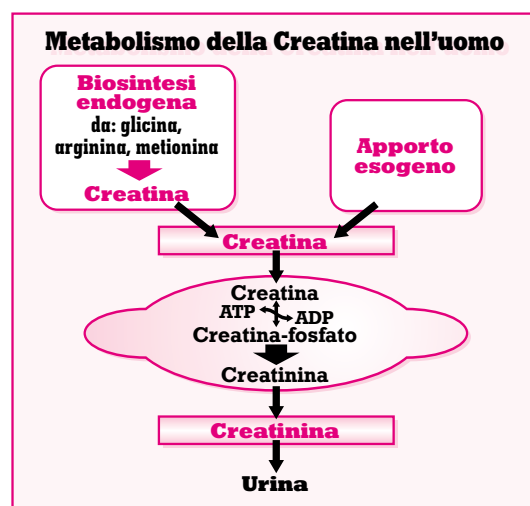
mali con differente attività fisica. Si era infatti osservato che negli animali in cattività la quantità di Creatina nel muscolo era circa 10 volte inferiore rispetto a quella degli stessi animali che vissero in libertà.

Le ricerche sul significato biologico della Creatina proseguirono, e nel 1927 Eggletons in Inghilterra e gli americani Fieske e Subbarow annunciarono, contemporaneamente ed indipendentemente, la scoperta della Creatina-fosfato.

Nel 1934 Lohmann scoprì la reazione catalizzata dall'enzima Creatina-chinasi, che oggi porta il suo nome, e formulò l'ipotesi che la Creatina-fosfato servisse come molecola fornitrice di energia in presenza di nucleotidi adeninici.

Negli anni '60 Davies dimostrò che l'utilizzazione di ATP durante la contrazione muscolare è in stretto rapporto con il sistema Creatina/Creatina-fosfato, poiché inibendo l'attività della Creatina-chinasi il muscolo era in grado di svolgere soltanto pochi cicli contrattili, e la contrazione cessava del tutto anche in presenza di elevate concentrazioni intramuscolari di ATP. Adeguati livelli di Creatina/Creatina-fosfato sono quindi essenziali per una normale attività contrattile muscolare.

La Creatina può essere ottenuta dall'organismo per via alimentare (ne sono particolarmente ricchi carne e pesce) o per sintesi, a partire dagli aminoacidi glicina, arginina e metionina (figura 5).



(Figura 5)

La sintesi ha luogo soprattutto nel fegato e nel pancreas, mentre i comparti di accumulo della Creatina stessa sono localizzati a livello del tessuto muscolare, soprattutto scheletrico (dove si localizza oltre il 95% del pool totale di questa sostanza), ma anche nel muscolo liscio e nel tessuto cardiaco. Il muscolo è in grado di accumulare Creatina al pro-

## Creatina: il ruolo nella funzionalità muscolare

prio interno mediante meccanismi di trasporto attivo contro gradiente, in grado di generare concentrazioni intracellulari della Creatina stessa superiori di circa 200 volte rispetto all'esterno.

La sintesi endogena e l'apporto esogeno devono compensare la perdita giornaliera di Creatina, sotto forma di Creatinina, che in un soggetto adulto e di peso medio (70 kg) è dell'ordine dei 2 grammi al giorno.

La Creatina, soprattutto sotto forma di Creatina-fosfato, è presente nel muscolo ad una concentrazione attorno a 120-130 mmoli/kg di sostanza secca. La Creatina-fosfato è presente sia nelle fibre a scossa rapida sia in quelle a scossa lenta; la sua concentrazione è più elevata nelle fibre a scossa rapida, o di potenza, nelle quali tende peraltro a diminuire più marcatamente dopo sforzo. La risintesi di Creatina-fosfato nella fase di recupero, processo ossigeno-dipendente influenzato dal pH, è invece più veloce nelle fibre a scossa lenta, o di resistenza, più riccamente vascolarizzate e più ricche di mitocondri.

Nel muscolo, il sistema Creatina/Creatina-fosfato svolge numerose attività cruciali per la contrazione ed il mantenimento dell'omeostasi biochimica.

Oltre all'effetto più noto (quello di tampone energetico), la Creatina infatti svolge un ruolo essenziale quale sistema di distribuzione e di trasporto dell'energia dalle sedi di sintesi a quelle di utilizzazione; essa controlla inoltre la concentrazione di ioni  $H^+$  durante la contrazione, previene l'aumento della concentrazione di ADP e controlla il rapporto ATP/ADP.

Il primo effetto, e cioè quello di tampone energetico, è essenziale quando la velocità di consumo dell'ATP, durante la contrazione muscolare, ecceda la velocità di sintesi dell'ATP stesso attraverso le vie della fosforilazione ossidativa o la glicolisi anaerobica. In queste condizioni la Creatina-fosfato cede il proprio fosfato ad alta energia ad una molecola di ADP, trasformandola in ATP. Questa reazione consuma uno ione  $H^+$ , e concorre pertanto, come si ricordava, al controllo del pH tissutale durante la contrazione muscolare.

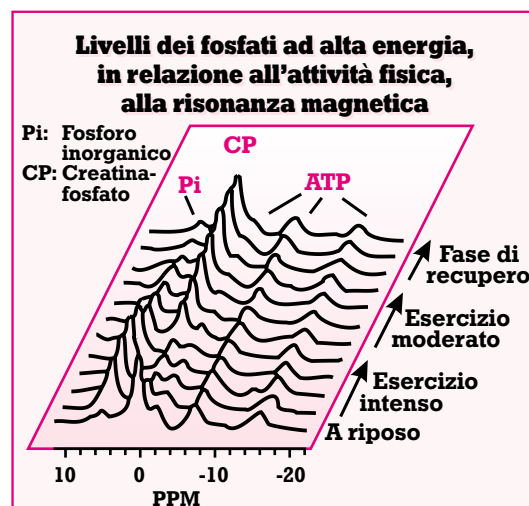
La Creatina-fosfato svolge anche un ruolo essenziale trasferendo energia dalle sedi nelle quali l'energia stessa è prodotta (soprattutto il mitocondrio) a quelle in cui essa è utilizzata. A tale scopo la cellula è dotata di una ricca serie di isoenzimi della Creatina-chinasi, rigidamente compartimentalizzati, che governano i meccanismi di cessione locale di energia alle varie strutture subcellulari.

Una prima Creatina-chinasi, situata a livello mitocondriale, è responsabile del trasferimento di un fosfato ad alta energia dall'ATP prodotto nel mito-

condrio alla Creatina. Essa genera al tempo stesso l'ADP che funge da accettore di fosfati ad alta energia durante la fosforilazione ossidativa. Una seconda Creatina-chinasi, localizzata nelle miofibrille in prossimità della linea M, permette il rilascio dell'energia necessaria alla contrazione. Altre Creatina-chinasi sono situate a livello del sarcolemma o del sarcoplasma; esse governano i meccanismi non contrattili del consumo energetico, che anche nella cellula muscolare rappresentano circa il 25% del totale.

Dal punto di vista fisiologico, come è noto, la Creatina è la molecola chiave per la contrazione muscolare. Durante la fase di recupero dopo sforzo, la risintesi di Creatina-fosfato procede in parallelo alla ripresa dell'attività contrattile; le concentrazioni intramuscolari di ATP, durante questi processi, si modificano invece in modo molto scarso. Nel soggetto anziano la risintesi di Creatina-fosfato dopo sforzo, e quindi la ripresa funzionale del muscolo, sono meno efficienti.

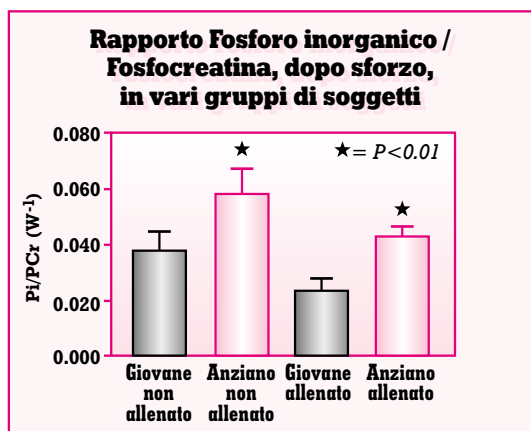
Mediante risonanza magnetica nucleare del fosforo 31 è possibile studiare questi fenomeni con notevole accuratezza. Durante lo sforzo, per esempio, il fosforo inorganico tende ad aumentare, mentre la Creatina-fosfato diminuisce; i picchi relativi ai tre fosfori dell'ATP si mantengono invece sostanzialmente inalterati (figura 6).



(Figura 6)

Con l'aumentare della durata dello sforzo, o con l'intensità dello sforzo stesso, il rapporto tra Fosforo inorganico e Creatina-fosfato tende a crescere, seppure con velocità variabile a seconda delle varie condizioni di lavoro; l'andamento del rapporto tra fosforo inorganico e Creatina-fosfato, pertanto, rappresenta un indice affidabile dell'efficienza del muscolo, aumentando durante la contrazione

## Creatina: il ruolo nella funzionalità muscolare



(Figura 7)

muscolare in modo tanto più lento quanto maggiore è l'efficienza energetica dei sistemi aerobici del muscolo scheletrico.

È interessante sottolineare, a questo proposito, che nel soggetto anziano l'intero sistema contrattile perde efficienza e pertanto, a parità di sforzo, il rapporto Fosforo inorganico/Creatina-fosfato cresce nell'anziano stesso più rapidamente che nel soggetto giovane. Nell'anziano allenato, rispetto all'anziano non allenato, la crescita del rapporto è più lenta, ma è tuttavia comunque superiore a quella che si osserva nel soggetto giovane con analogo training fisico (figura 7).

Anche il consumo massimale di ossigeno è ridotto nel soggetto anziano.

La ridotta efficienza di questi meccanismi nel soggetto anziano può essere favorevolmente influenzata dall'apporto di Creatina esogena. Poiché l'incorporazione di questa sostanza nel muscolo dipende essenzialmente dalla differenza tra la concentrazione della Creatina stessa nel tessuto muscolare, spesso depressa nel soggetto anziano, e la capacità massimale del tessuto muscolare di contenere Creatina, che si situa attorno ai 150 mmoli per kg di peso secco, tale processo può essere molto efficiente nel soggetto anziano.

In conclusione, la Creatina, nelle sue forme libera e fosforilata gioca un ruolo essenziale nella regolazione del metabolismo energetico del muscolo scheletrico. Una buona funzionalità di tale sistema si traduce infatti in un miglioramento della funzione contrattile del muscolo, permettendo di mantenere un adeguato turnover di ATP durante l'attività muscolare, con una più alta velocità di risintesi della CP e un miglioramento del metabolismo energetico del muscolo, con conseguente aumento della capacità di svolgere attività fisica.

- ◆ *Nel soggetto anziano le masse muscolari tendono ad impoverirsi di fibre di tipo II, o di potenza. I circuiti metabolici che liberano energia attraverso la fosforilazione ossidativa, nonché il sistema Creatina/Creatina-fosfato, perdono inoltre efficienza, ed il consumo massimo di ossigeno si riduce del 25-50%.*
- ◆ *La Creatina può essere ottenuta dall'organismo per via alimentare o per sintesi endogena. Essa si accumula a livello del muscolo dove, soprattutto sotto forma di Creatina-fosfato, è presente ad una concentrazione attorno a 100-120 mmoli per kg di sostanza secca.*
- ◆ *Nel muscolo, il sistema Creatina/Creatina-fosfato svolge un ruolo essenziale di "tampone energetico", trasferisce l'energia dalle sedi di sintesi a quelle di utilizzazione, contribuisce a controllare la concentrazione di ioni  $H^+$  durante la contrazione, previene l'aumento della concentrazione di ADP e controlla il rapporto ATP/ADP.*
- ◆ *Nel soggetto anziano, a parità di sforzo, il rapporto Fosforo inorganico/Creatina-fosfato (indice inverso di efficienza contrattile) cresce più rapidamente che nel soggetto giovane; anche la risintesi di Creatina-fosfato dopo sforzo, e quindi la ripresa funzionale del muscolo, sono meno efficienti.*
- ◆ *La ridotta efficienza di questi meccanismi nel soggetto anziano può essere favorevolmente influenzata dall'apporto di Creatina esogena, per via alimentare o mediante integrazione mirata.*

# Fosfatidilserina: ruolo nell'invecchiamento cerebrale

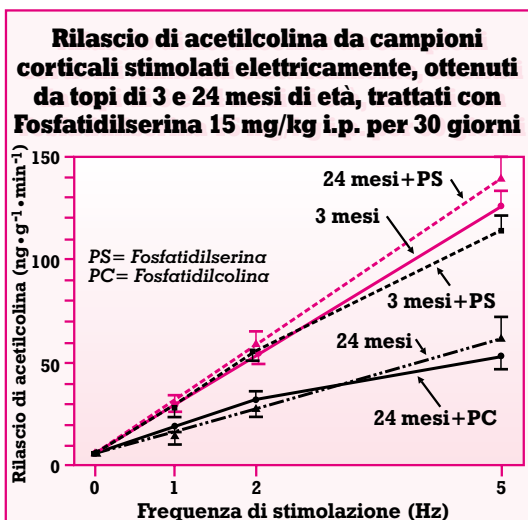
Giancarlo Pepeu (Università di Firenze)

**L**e ricerche sul ruolo della Fosfatidilserina nell'invecchiamento cerebrale datano ormai da circa 20 anni, durante i quali sono state raccolte informazioni di notevole interesse. Gli effetti farmacologici di questa sostanza continuano tuttavia ad attrarre l'attenzione dei ricercatori, anche perché questi effetti non sono ancora ben compresi nel loro meccanismo d'azione. Nel 1985 dati sperimentali del nostro gruppo mostrarono, su fettine di encefalo di ratto, che la Fosfatidilserina era in grado di influenzare il rilascio di acetilcolina da parte del tessuto cerebrale in risposta ad una stimolazione elettrica. Nel ratto anziano (24 mesi di età), in particolare, il rilascio di acetilcolina a seguito di una stimolazione elettrica è marcatamente ridotto (-50% circa), rispetto a quanto si osserva nel ratto di 3 mesi; il pretrattamento di questi ratti anziani per 30 gg con 15 mg/kg di Fosfatidilserina, per via intra peritoneale, è tuttavia in grado di ripristinare una normale risposta encefalica allo stimolo elettrico (figura 8). La specificità della risposta osservata è dimostrata dal fatto che la somministrazione di Fosfatidilcolina non svolge alcun effetto sul parametro misurato; la somministrazione di Fosfatidilserina al ratto giovane, allo stesso modo, è pure priva di effetti. Alcuni anni dopo un esperimento analogo è stato effettuato, sempre dal nostro gruppo, con la tecnica della microdialisi, ed i risultati sono stati sostanzialmente confermati. In questo studio si osservò che era sufficiente una durata di 7 giorni del pretrattamento con Fosfatidilserina per rilevare l'effetto di aumento sul rilascio di acetilcolina.

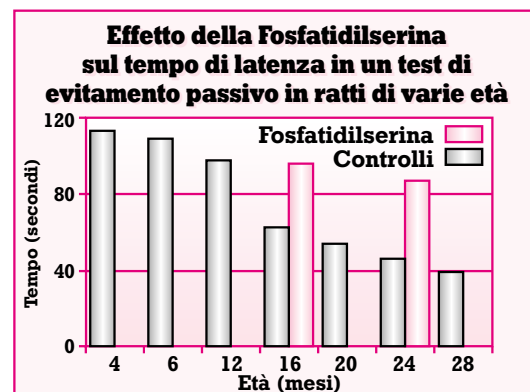
Il meccanismo di questa azione farmacologica della Fosfatidilserina non è noto. Nel ratto trattato con Fosfatidilserina la concentrazione extracellulare di colina nel cervello, che è in genere ridotta nel ratto anziano rispetto al ratto giovane, tende a normalizzarsi.

Anche l'utilizzabilità della colina per la sintesi dell'acetilcolina aumenta dopo il trattamento con Fosfatidilserina (ma non dopo un pretrattamento con Fosfatidilcolina), e questa osservazione può permettere di spiegare, almeno parzialmente, l'effetto osservato sul rilascio dell'acetilcolina stessa. A questi effetti biochimici corrisponde, nel ratto, una chiara dimostrazione di effetti comportamentali. Il modello più studiato, a questo proposito, è quello dell'evitamento passivo. Il ratto viene addestrato a non entrare in una piccola camera buia (l'ambiente che lui preferisce), ed a rimanere invece nello spazio aperto ed illuminato in cui si trova (a lui meno gradito), somministrandogli una punizione quando entra nella camera buia. Dopo l'addestramento, si misura il tempo che precede, nell'animale studiato, l'ingresso nella camera buia (tempo di latenza).

Questa latenza tende a diminuire nel ratto al crescere dell'età, iniziando a ridursi verso i 16 mesi, per poi calare ulteriormente a 20 o 24 mesi di età. Sia il nostro gruppo di ricerca sia altri gruppi negli USA hanno osservato che in ratti di 16 e 24 mesi il pretrattamento con Fosfatidilserina ripristina tempi di latenza, al test dell'evitamento passivo, analoghi a quelli osservati in ratti "giovani" (4-6 mesi di età) (figura 9). Corwin, nel 1985, mostrò, in un analogo contesto sperimentale, che anche una singola somministrazione di Fosfatidilserina modificava il tempo di latenza nel ratto, che aumentava di circa 6 volte dopo somministrazione di una dose



(Figura 8)



(Figura 9)

## Fosfatidilserina: ruolo nell'invecchiamento cerebrale

di 25-50 mg/kg, rispetto al placebo. L'effetto osservato era chiaramente dose-dipendente.

Il trasferimento di questi dati alla clinica è naturalmente complesso e deve essere cauto; esiste tuttavia un buon numero di ricerche cliniche condotte con la Fosfatidilserina sull'uomo, sia in pazienti affetti da demenza di Alzheimer, diagnosticata con certezza, sia in pazienti con quadri meno precisamente caratterizzati di "invecchiamento cerebrale", che hanno prodotto risultati interessanti.

Sono stati infatti pubblicati ben 35 studi, per un totale di circa 1.000 soggetti trattati; di questi, 7 erano stati eseguiti secondo la classica metodica in doppio cieco contro placebo.

Il primo studio controllato, multicentrico, è stato pubblicato da Amaducci nel 1988. Lo studio riguardava 145 soggetti, con malattia di Alzheimer accuratamente definita, nei quali venivano valutati numerosi parametri di tipo cognitivo e comportamentale (figura 10).

Studio Multicentrico della Fosfatidilserina nella malattia di Alzheimer		
	Disegno	Risultati clinici
Amaducci et al, Psychopharmacol. Bulletin 24, 1, 130-134, 1988	Doppio cieco su 145 pazienti	Abilità verbale: ↑ p<0,005
		Memoria: ↑ p<0,01
		Attività quotidiane: ↑ p<0,05

(Figura 10)

Gli autori osservarono un miglioramento significativo indotto dal trattamento con Fosfatidilserina sull'abilità verbale, sui test di memorizzazione, e sulla capacità di gestire le attività quotidiane (daily living).

Un secondo studio di Crook, pubblicato nel 1991, su soggetti con "deficit di memoria associato all'età", mostrava un chiaro e significativo effetto della Fosfatidilserina su questo parametro. Successivamente, lo stesso autore osservò un effetto protettivo del trattamento con Fosfatidilserina anche in un gruppo di pazienti con malattia di Alzheimer. Un lavoro del 1994 che confrontava, sempre nella malattia di Alzheimer, un trattamento di tipo cognitivo-comportamentale con la somministrazione di Fosfatidilserina o di un altro farmaco, il Pirritinolo, mostrò un effetto più ampio dei due farmaci, rispetto al trattamento di confronto, su alcuni dei parametri in esame.

In un successivo studio italiano sono stati trattati per 6 mesi con Fosfatidilserina 247 pazienti di età superiore ai 65 anni con deficit cognitivi da moderati a severi; il farmaco ha indotto un miglioramen-

to sia cognitivo sia comportamentale.

In tempi molto recenti si è reso necessario sostituire la Fosfatidilserina ottenuta dal cervello bovino con una ottenuta da altre fonti. Sono state quindi condotte ricerche di confronto fra Fosfatidilserine di diversa origine. Un lavoro del 1999, condotto sul ratto valutando aspetti di carattere cognitivo, ha mostrato che la Fosfatidilserina estratta dalla soia ha un effetto analogo a quella della Fosfatidilserina di origine bovina, mentre la Fosfatidilserina preparata a partire dall'uovo, per motivi non chiari, non svolgerebbe un effetto analogo.

L'interesse sugli effetti biochimici della Fosfatidilserina rimane comunque elevato. Una recente ricerca su Medline ha identificato oltre 50 lavori, pubblicati negli ultimi due anni, che riguardano questa molecola. Recentemente, si è per esempio data importanza al ruolo della collocazione della Fosfatidilserina nelle membrane cellulari.

La Fosfatidilserina è internalizzata nella cellula prima di essere incorporata nelle membrane, ed è poi reperibile solo nel foglietto interno della membrana stessa. In alcune condizioni, tuttavia, la Fosfatidilserina viene "esternalizzata", e questo fenomeno sembra essenziale per l'attivazione o il decorso di processi complessi come la fagocitosi, l'apoptosi o la aggregazione piastrinica.

La Fosfatidilserina continua a suscitare un notevole interesse per il trattamento dell'invecchiamento cerebrale e delle sue complicanze. C'è da augurarsi che la ricerca sugli effetti fisiologici e farmacologici di questa sostanza continui, e sveli i meccanismi alla base delle sue ben dimostrabili azioni farmacologiche.

- ◆ *La Fosfatidilserina è in grado di aumentare il rilascio di acetilcolina da parte del tessuto cerebrale. Nel ratto anziano, in particolare, il pretrattamento con Fosfatidilserina ripristina una normale rilascio neuronale di acetilcolina in risposta ad uno stimolo elettrico.*
- ◆ *Sul piano comportamentale, il pretrattamento con Fosfatidilserina di ratti "anziani" ripristina tempi di latenza, in test di evitamento passivo, analoghi a quelli osservati in ratti di 4-6 mesi di età.*
- ◆ *In soggetti con "deficit di memoria associato all'età" di grado lieve, la Fosfatidilserina ha mostrato un effetto significativo su alcuni test di memorizzazione.*
- ◆ *Anche in soggetti con deficit cognitivi da moderati a severi, il trattamento con Fosfatidilserina ha indotto miglioramenti sia cognitivi sia comportamentali.*

# Stress ossidativo ed antiossidanti

Claudio Galli (Università di Milano)

**L**a relazione tra alimentazione, antiossidanti e stress ossidativo riveste particolare interesse ed importanza nella letteratura scientifica moderna. Un eccessivo stress ossidativo, infatti, è probabilmente implicato nella patogenesi di molte malattie degenerative, come l'aterosclerosi e le neoplasie, molto frequenti nelle nostre società. Sono numerosi i processi biologici che portano alla formazione di radicali liberi in eccesso, causa prima degli effetti biologici dello stress ossidativo stesso. La produzione di radicali liberi, tuttavia, in alcune cellule, quali i monociti ed i macrofagi, contribuisce ad alcune funzioni essenziali della cellula (ad es. l'eliminazione delle cellule batteriche fagocitate); essi concorrono poi, in tutte le cellule, ad alcuni dei processi di attivazione/deattivazione di specifici geni, mediante meccanismi recentemente descritti. In larga parte, tuttavia, i radicali liberi rappresentano sottoprodotti di reazioni metaboliche, risultanti da interazioni con l'ossigeno, o il risultato di insulti di varia natura (fisica, chimica, ecc.) portati alla cellula. Ne conseguono ulteriori interazioni con molecole di grande rilevanza biologica (proteine, acidi nucleici, lipidi, ecc.). Per controllare gli effetti nocivi di queste sostanze, la cellula è normalmente dotata di un ricco corredo di difese antiossidanti. Gli antiossidanti non enzimatici vengono classicamente divisi in lipofili (licopene, vitamina E,  $\beta$ -carotene) o idrofili (vitamina C, glutathione, albumina); recentemente è aumentato molto l'interesse per composti a caratteristiche anfifiliche (contemporaneamente, e parzialmente, idrofile e lipofile), presenti in alimenti di origine vegetale, studiate in dettaglio anche dal nostro gruppo. Esistono poi antiossidanti enzimatici (SOD, o superossidodismutasi, catalasi, glutathione-perossidasi) e sistemi enzimatici ancillari. È importante ricordare che questi meccanismi e processi protettivi devono essere considerati nella loro integrità, sia perché la loro azione differisce, e talora in modo marcato, da molecola a molecola,

sia perché molti di questi composti tendono a svolgere effetti sinergici tra loro (ad esempio, la vitamina E e la vitamina C).

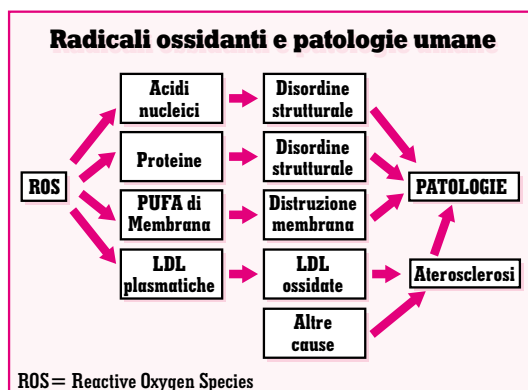
I radicali liberi possono legarsi, danneggiandoli, a quasi tutti i componenti dell'organismo. Sono in particolare esposti al loro insulto proteine ed acidi nucleici, acidi grassi polinsaturi e le LDL plasmatiche. L'interazione tra radicali liberi e le molecole target prima ricordate genera abitualmente alterazioni strutturali delle molecole colpite, e delle strutture che le accolgono (ad esempio le membrane cellulari nel caso degli acidi grassi polinsaturi), che poi innescano o facilitano in vario modo la comparsa o l'evoluzione di specifiche patologie (figura 11).

Il ruolo delle LDL modificate nell'aterogenesi, per esempio, è ben noto. Steinberg ed Esterbauer hanno per primi sottolineato l'importanza di queste particelle nella formazione e nella progressione delle placche aterosclerotiche, aprendo un filone di ricerca poi sviluppato anche dalla scuola italiana. Le LDL, una volta ossidate, non vengono più adeguatamente riconosciute dai loro recettori specifici, e vengono captate per via non recettoriale dai monociti-macrofagi, favorendo anche l'ingresso di queste cellule nella parete arteriosa. A questo livello, le LDL ossidate facilitano la comparsa di proteine di adesione (che aumentano l'infiltrazione cellulare della parete), riducono la sintesi del Nitrossido e della Prostaciclina, composti ad azione protettiva prodotti dalla parete arteriosa, e svolgono azioni di tipo proinfiammatorio.

Il coinvolgimento delle LDL ossidate nell'aterogenesi è ben supportato dai dati di varia natura. Particelle lipoproteiche con caratteristiche tipiche delle LDL ossidate sono reperibili nelle lesioni aterosclerotiche, eventualmente mediante l'uso di anticorpi specifici. In soggetti con malattia aterosclerotica, è talora reperibile la presenza di autoanticorpi contro loro epitopi superficiali. Gli antiossidanti, che possono bloccare o limitare l'ossidazione delle LDL, rallentano inoltre il processo dell'aterogenesi.

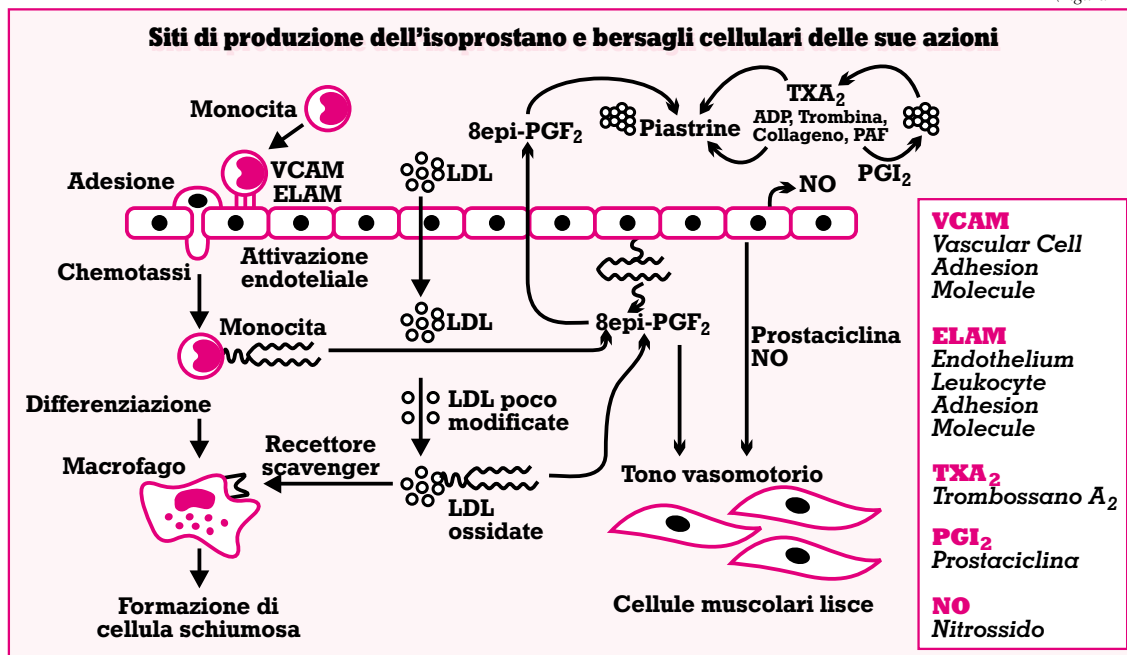
Lo studio del processo ossidativo, sul piano metodologico, è complesso. I radicali liberi, infatti, hanno una vita estremamente breve, e la determinazione della loro presenza in tessuti o sistemi biologici, pertanto, è di fatto impossibile. È possibile invece valutare e definire la suscettibilità all'ossidazione di possibili bersagli molecolari, o identificare sostanze che siano prodotte durante, o in conseguenza, di questi processi (biomarkers). La ricerca in quest'ultimo settore ha prodotto, negli ultimi anni, avanzamenti significativi.

La determinazione delle LDL con carica negativa,



(Figura 11)

(Figura 12)



che molti studi suggeriscono riflettere la presenza di LDL ossidate nel plasma, è uno di questi esempi. E' oggi inoltre possibile valutare quantitativamente la presenza di alcuni "biomarkers" di ossidazione lipidica (gli isoprostani) nel plasma o tra i composti eliminati con le urine. In modo analogo, si può dosare nei leucociti circolanti o nelle urine un prodotto di ossidazione del DNA, la 8-idrossi-deossiguanina, la cui presenza riflette il danno ossidativo subito dal DNA stesso.

Va sottolineato che sul piano concettuale queste determinazioni sono più significative di quelle di suscettibilità (la determinazione ad esempio, dell'ossidabilità delle LDL in condizioni controllate), in quanto esse danno un'idea più diretta del livello dei fenomeni ossidativi *in vivo*.

Tra i prodotti del metabolismo ossidativo lipidico hanno ultimamente guadagnato molto interesse, come si ricordava, gli isoprostani. Queste molecole sono generate dall'attacco da parte di radicali liberi a vari acidi grassi polinsaturi; a differenza delle prostaglandine, che originano dagli stessi substrati, gli isoprostani sono prodotti da reazioni non enzimatiche.

Gli isoprostani sono una famiglia molto ricca di composti: un numero elevato di molecole di questo gruppo deriva sia dall'acido arachidonico, sia dagli acidi grassi omega-3 a più lunga catena (DHA ed EPA) sia ancora, seppure in misura minore, dall'acido alfa-linolenico. Dei numerosi isoprostani esistenti, viene oggi frequentemente misurato l'8epi-PGF<sub>2</sub>. Questa sostanza può essere dosata nel plasma o nelle urine; la sua concentra-

zione in questi fluidi è aumentata nei soggetti fumatori o diabetici, che sono sottoposti ad uno stress ossidativo aumentato.

Gli isoprostani, oltre ad indicare il livello di ossidazione nell'organismo, partecipano probabilmente in modo attivo al danneggiamento tissutale che si osserva nel processo dell'aterogenesi. Queste sostanze, infatti, contribuiscono a limitare la disponibilità di Nitrossido a livello endoteliale, promuovono la sintesi di molecole di adesione che aumentano l'infiltrazione cellulare della parete arteriosa, riducono la produzione di Prostacylina, aumentano il tono muscolare, favoriscono l'aggregazione piastrinica e svolgono inoltre un effetto proossidante residuo (figura 12).

Anche la definizione e lo studio dei composti antiossidanti nella dieta sono importanti nella comprensione globale di questi processi. La dieta è infatti ricca di molti composti antiossidanti, dotati di effetti differenti (alcune sostanze bloccano la produzione di radicali liberi, altre chelano i metalli pesanti che ne facilitano la formazione, o distruggono direttamente i radicali liberi, o ancora bloccano la propagazione dell'ossidazione a molecole contigue).

Tra i composti cui abbiamo dedicato recentemente attenzione vanno ricordati quelli reperibili nell'olio extravergine di oliva, e soprattutto nelle acque di vegetazione di questo olio, come l'oleuropeina e l'idrossitirosole. Sugli effetti di queste molecole sono attualmente in corso progetti europei di ricerca collaborativa coordinati dal nostro laboratorio. Queste sostanze, altamente biodisponibili

## Stress ossidativo ed antiossidanti

Chimica	Concentrazioni	Attività in vitro	Dati in vivo
<b>HT e OE</b>	<b>OO: ~150 mg/L</b> <b>Olive: 2-3 g/kg</b>	<b>AO nei riguardi delle LDL</b> <b>Funzioni cellulari ed enzimi:</b>	<b>Biodisponibile nell'uomo (OO)</b> <b>↑ attività AO nel plasma</b>
<p><b>AO:</b> antiossidante  <b>ROS:</b> specie reattive dell'ossigeno  <b>HT:</b> idrossitirosole  <b>OE:</b> oleuropeina  <b>OO:</b> olio di oliva</p> <p><b>Piastri:</b> ↓ aggregazione  <b>Leucociti:</b> ↓ LTB<sub>4</sub>  <b>Macrofagi:</b> ↓ ROS  <b>Macrofagi:</b> ↑ sintesi di NO</p>			

(Figura 13)

nell'uomo, svolgono alcune attività di notevole interesse. Esse aumentano il potere antiossidante nel plasma, riducono l'escrezione urinaria di isoprostani nel ratto sottoposto a stress ossidativo (mediante il fumo di sigaretta), e svolgono inoltre un'azione antiaggregante ed antileucotrienica (figura 13).

L'ultimo elemento da considerare, nel valutare il ruolo dello stress ossidativo e degli antiossidanti nell'aterogenesi, è la definizione dell'effetto degli antiossidanti stessi sugli eventi clinici correlati alla malattia aterosclerotica. Un simile approccio ha una notevole plausibilità biologica (gli antiossidanti bloccano l'ossidazione delle LDL, che rappresenta probabilmente il meccanismo attraverso il quale questi fenomeni sono aterogeni); gli studi di carattere osservazionale, inoltre, mostrano l'esistenza di una relazione inversa continua e molto consistente tra livelli di antiossidanti (nella dieta o nel plasma) e rischio coronarico.

In due ampie coorti statunitensi, Nurses' Health Study e Health Professional Follow-up Study, per esempio, i soggetti con assunzione elevata di vitamina E avevano, nel tempo, un rischio ridotto di incorrere in eventi coronarici fatali e non fatali. La somministrazione di vitamina E in studi controllati, secondo protocolli contro placebo, ha invece portato a risultati meno chiari. In prevenzione primaria questo intervento non sembra produrre alcun effetto protettivo, mentre in prevenzione secondaria i risultati sono meno omogenei, osservandosi sia risultati favorevoli sia risultati sostanzialmente nulli. E' possibile che la strategia più corretta per interventi con antiossidanti sia quella di somministrarli a soggetti in cui vi è evidenza di un incremento di produzione radicalica (es. incremento di isoprostani urinari), mentre la somministrazione di antiossidanti sarebbe meno razionale in soggetti in cui tale condizione non sia presente. In conclusione, il ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi dell'aterosclerosi va considerato ben definito. L'uso di alcuni antiossidanti con obiettivi

preventivi in trial clinici ha fornito risultati incerti, ma questi apparenti fallimenti potrebbero essere attribuibili ad errori nella selezione del dosaggio, molto elevato in alcuni degli studi ricordati (non va dimenticato che alcuni antiossidanti sono in realtà pro-ossidanti in queste condizioni), all'uso di singole molecole invece che di miscele di antiossidanti, come accade abitualmente nella dieta, alla incapacità a identificare i soggetti con ridotte capacità antiossidanti, o elevato stress ossidativo, nei quali probabilmente questo intervento potrebbe avere un migliore effetto.

- ◆ *Un eccessivo stress ossidativo è implicato nella patogenesi di malattie degenerative frequenti nelle nostre società, come l'aterosclerosi e le neoplasie.*
- ◆ *E' oggi possibile misurare l'entità dello stress ossidativo nell'organismo valutando la presenza di alcuni "biomarkers" di ossidazione, come gli isoprostani o la idrossideossiguani-na.*
- ◆ *La dieta è ricca di composti antiossidanti dotati di effetti differenti: alcuni antiossidanti bloccano la produzione di radicali liberi, o li distruggono direttamente, o ancora bloccano la propagazione dell'ossidazione a molecole contigue.*
- ◆ *L'uso di antiossidanti con obiettivi di prevenzione coronarica in trial clinici ha fornito risultati incerti; ciò va probabilmente attribuito ad errori nella scelta del dosaggio, all'uso di singole molecole invece che di miscele di antiossidanti, o alla incapacità a identificare i soggetti con ridotte capacità antiossidanti o elevato stress ossidativo, nei quali l'intervento avrebbe probabilmente effetti migliori.*

# Vitamine, omocisteina, acido folico: effetti cardiovascolari

Andrea Poli (Università di Milano)

**S**ostanze ad attività vitaminica possono svolgere effetti di carattere preventivo nei riguardi della malattia coronarica. Alcune vitamine antiossidanti e due vitamine attive sul metabolismo dell'aminoacido omocisteina, in particolare, sono candidati ad un ruolo nella prevenzione cardiovascolare.

Le vitamine antiossidanti (e specificamente la vitamina E, la vitamina C ed il  $\beta$ -carotene, o provitamina A) sono state riccamente studiate in tal senso, sulla base del razionale teorico esaminato dal Prof. Galli nel suo intervento (vedi pag. 10).

I risultati degli studi osservazionali e degli studi di intervento con queste molecole offrono risultati che non concordano tra di loro. L'esame di questi dati può essere utile per valutare il ruolo esatto di questi composti in prevenzione.

Nello Skin Cancer Prevention Study (SCPS), circa 1.800 soggetti di ambo i sessi sono stati arruolati in uno studio osservazionale seguito da una fase di intervento, che aveva l'obiettivo di definire il ruolo del  $\beta$ -carotene nella prevenzione delle neoplasie non-melanomatose della cute.

I soggetti arruolati sono stati seguiti per circa 8 anni; per una media di 4,3 anni essi hanno anche assunto 50 mg/die di  $\beta$ -carotene oppure un placebo. All'arruolamento sono stati anche determinati valori della concentrazione ematica di  $\beta$ -carotene. I soggetti con concentrazioni basali elevate di  $\beta$ -carotene hanno avuto, nel tempo, un ridotto rischio di mortalità neoplastica, di mortalità cardiovascolare e di mortalità per tutte le cause (il rischio di tali fenomeni era ridotto, nei soggetti del IV quartile rispetto a quelli del I quartile, ri-

spettivamente, del 21%, del 43% e del 38% in analisi multivariata). Durante lo studio di intervento, invece, il rischio di incorrere in uno degli endpoints descritti non si è modificato in maniera significativa.

E' opportuno sottolineare che la differenza nella concentrazione plasmatica di  $\beta$ -carotene, pari ad un fattore 2 all'inizio dello studio, è stata pari ad un fattore 10 durante lo studio di intervento.

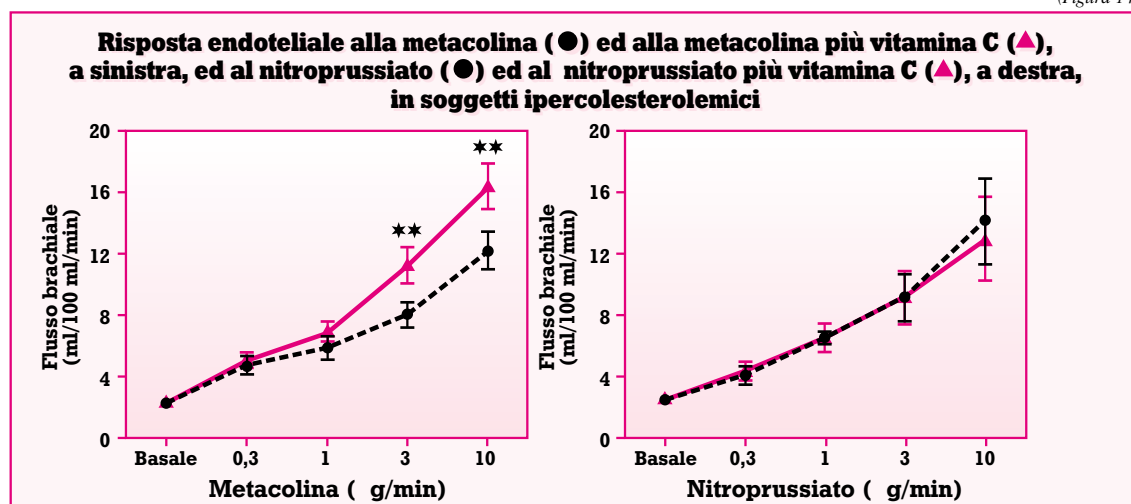
La presenza di concentrazioni plasmatiche spontaneamente elevate di  $\beta$ -carotene, in altre parole, si associa ad una protezione da eventi clinici (mortalità cardiovascolare e neoplastica) che la somministrazione di  $\beta$ -carotene non è invece in grado di ottenere.

Risultati sostanzialmente analoghi sono stati ottenuti negli studi con vitamina E. Anche in questo caso, i risultati degli studi di osservazione sono stati solo parzialmente confermati dagli studi di intervento, che prevedevano la somministrazione di dosi elevate o molto elevate di questa sostanza (300-800 mg/die).

Nel recentissimo studio HOPE e nello studio GISSI, in particolare, il trattamento con vitamina E non ha ridotto la mortalità coronarica in soggetti con storia di infarto recente (GISSI) o comunque ad alto rischio coronarico (studio HOPE).

Studi di questa natura non sono stati a tutt'oggi condotti con la vitamina C; questa molecola, tuttavia, ha dimostrato in studi di carattere preclinico la capacità di influenzare favorevolmente alcuni aspetti funzionali della parete vasale (essenzialmente la risposta a stimoli di natura vasodilatato-

(Figura 14)



## Vitamine, omocisteina, acido folico: effetti cardiovascolari

ria) che sono considerati eccellenti end-points surrogati delle prime fasi della malattia aterosclerotica.

In soggetti con anomala risposta dell'endotelio a stimoli vasodilatatori, per la presenza di ipercolesterolemia familiare, o per abitudine al fumo, la vitamina C ripristina una condizione di normalità dei parametri studiati (figura 14). E' possibile che tale risposta sia attribuibile alla capacità della vitamina C di aumentare l'emivita del Nitrossido (NO), il cui catabolismo è eminentemente ossidativo. L'assenza di effetto della vitamina C, nello stesso modello, in soggetti rispettivamente normocolesterolemici o non fumatori (e quindi, probabilmente, a normale stress ossidativo), suggerisce l'importanza di una corretta definizione del paziente da trattare con antiossidanti per ottenere risultati clinici.

Sulla base dei dati disponibili sembra pertanto potersi concludere che l'uso clinico di molecole antiossidanti, attualmente, può essere pertanto ipotizzato per dosaggi non farmacologici, nel contesto di una dieta variata, ed in associazione ad altre molecole con effetti antiossidanti analoghi più che in monosomministrazione.

Differente è la situazione relativa all'acido folico, ed in minore misura alla vitamina B6, relativamente alle quali si vanno accumulando informazioni ben strutturate che suggeriscono che queste molecole, grazie probabilmente alla loro capacità di ridurre la concentrazione plasmatica dell'aminoacido omocisteina, possono contribuire a ridurre, ed in modo significativo, il rischio cardiovascolare.

L'omocisteina, aminoacido derivato per demetilazione dalla metionina, può essere infatti riconvertito a metionina grazie all'intervento di un enzima

che ha come cofattore l'acido folico, o essere eliminato per via urinaria, per intervento di un altro enzima che ha come cofattore invece la vitamina B6.

Concentrazioni crescenti di omocisteina si associano ad un aumento del rischio di incorrere in eventi coronarici fatali e non fatali, e del rischio di ictus (figura 15).

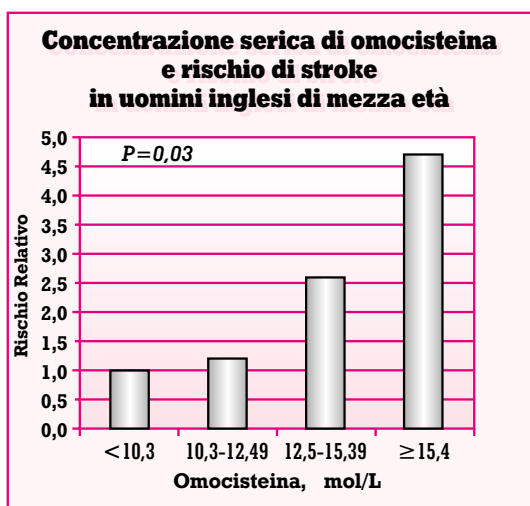
In presenza di omocisteinemia elevata, la funzione dell'endotelio vascolare è depressa (disfunzionante), e la risposta a stimoli vasodilatatori endotelio-dipendenti (acetilcolina, metacolina, flow-derived dilatation, o FDD) è ridotta. Lo stesso fenomeno si osserva, in acuto, dopo un carico di metionina, che l'organismo converte parzialmente in omocisteina nell'arco di alcune ore. Poiché la cosomministrazione di vitamina C (che come è ben noto è un efficace antiossidante) ripristina una normale risposta dell'endotelio a questi stimoli, è ragionevole supporre che parte dell'effetto di danno indotto dall'omocisteina a livello endoteliale sia di natura ossidativa.

A livello di popolazione, la relazione tra l'assunzione di acido folico o vitamina B6 e rischio vascolare è documentata da una ricca serie di osservazioni. Nella coorte del Nurses' Health Study, ricercatori di Boston hanno identificato una relazione inversa tra il consumo di acido folico o di vitamina B6 ed il rischio coronarico. I soggetti del V quintile di consumo (che in ambedue i casi erano largamente oltre le assunzioni giornaliere raccomandate dai nostri LARN), confrontati con quelli del quintile inferiore, beneficiavano di un rischio coronarico ridotto del 30% circa.

Un'analogia relazione si è osservata, in uno studio di coorte canadese, tra le concentrazioni plasmatiche di acido folico ed il rischio di morte coronarica; la relazione, in questo studio, era evidente in ambedue i sessi, ed era altamente significativa anche tra i soggetti con età superiore a 65 anni.

Questi studi, di carattere osservazionale, non permettono peraltro sul piano teorico di escludere che il rapporto tra questi composti vitaminici ed il rischio coronarico sia di natura non causale. Un recente studio di intervento, condotto secondo lo schema classico (in doppio cieco, con randomizzazione, contro placebo), suggerisce tuttavia l'esistenza di una simile relazione.

In circa 150 soggetti, con parenti di primo grado affetti da malattia coronarica precoce, trattati per due anni con dosi elevate di acido folico e vitamina B6 (5 mg/die e 250 mg/die, rispettivamente), gli autori hanno infatti riscontrato, oltre ad un netto calo dell'omocisteina plasmatica, una riduzione del 40% circa, significativa sul piano statisti-



(Figura 15)

## Vitamine, omocisteina, acido folico: effetti cardiovascolari

<b>Effetti del trattamento con folati e vitamina B6 su end-points prestabiliti correlati alla malattia aterosclerotica</b>		
	RR	P
ECG da sforzo patologico	0,40	0,035
Indice pressorio caviglia/braccio patologico	0,87	n.s.
Eco-doppler femorale patologico	1,02	n.s.
Eco-doppler carotideo patologico	0,86	n.s.

RR = Rischio Relativo

(Figura 16)

co, della comparsa di test elettrocardiografici con alterazioni di natura ischemica (figura 16). In attesa dei risultati di studi di intervento ben più ampi, che si concluderanno entro alcuni anni, i risultati di questo studio supportano pertanto l'ipotesi che l'integrazione alimentare con acido folico e vitamina B6 si associ ad una migliore prognosi vascolare. Una simile integrazione ha particolare significato nel soggetto anziano, nel quale l'apporto di queste vitamine, e segnatamente dell'acido folico, è spesso insufficiente e talora francamente deficitaria.

- ◆ *Concentrazioni crescenti di omocisteina, un aminoacido derivato per demetilazione dalla metionina, si associano ad un aumento del rischio di incorrere in eventi coronarici fatali e non fatali, e del rischio di ictus.*
- ◆ *Elevate assunzioni alimentari di acido folico e di vitamina B6, che sono in grado di ridurre la concentrazione plasmatica dell'omocisteina stessa, controllano, secondo numerosi studi di carattere osservazionale, il rischio cardiovascolare.*
- ◆ *Un'analoga relazione si è osservata tra le concentrazioni plasmatiche di acido folico ed il rischio di morte coronarica; la relazione, in questo studio, era evidente in ambedue i sessi, ed era altamente significativa anche tra i soggetti con età superiore a 65 anni.*
- ◆ *In un recente studio di intervento randomizzato contro placebo, condotto su soggetti ad alto rischio coronarico trattati con 5 mg/die di acido folico e 250 mg/die di vitamina B6, si è osservato, oltre ad un netto calo dell'omocisteina plasmatica, una riduzione del 40% della comparsa di test elettrocardiografici da sforzo con alterazioni di natura ischemica.*

# Antiossidanti, acido folico, creatina e sistema nervoso centrale: uno scenario in evoluzione

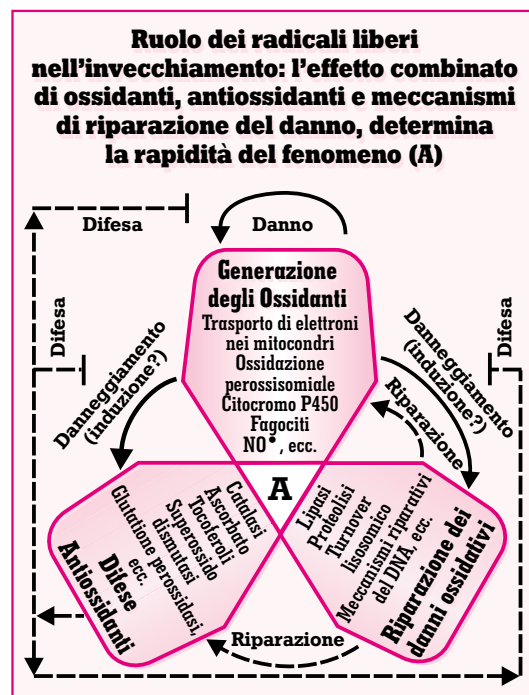
Stefano Govoni (Università di Pavia)

L'invecchiamento cerebrale è un processo complesso e non facile da definire con precisione; sotto questa definizione convivono probabilmente condizioni di notevole diversità. E' tuttavia importante sottolineare che, secondo recenti vedute, nell'invecchiamento cerebrale "fisiologico" la perdita di neuroni è in genere molto limitata, o virtualmente assente. Le osservazioni antecedenti, che avevano invece documentato una diminuzione della consistenza della popolazione neuronale al crescere dell'età, erano infatti contaminate da dati ottenuti su cervelli patologici. Questa considerazione ha ovvie implicazioni di carattere terapeutico e prognostico. La presenza di un numero adeguato di cellule vitali nel cervello senescente fornisce infatti il razionale per terapie di carattere funzionale e metabolico, orientate a migliorare la situazione cognitiva globale, che avrebbero evidentemente poco significato, invece, in assenza di tali elementi cellulari o in condizioni di loro marcato impoverimento.

L'ipotesi di un coinvolgimento dei radicali liberi nell'invecchiamento cerebrale è dotata di un buon supporto sperimentale, ed è ben nota agli esperti del settore. E' tuttavia importante sottolineare che una situazione di eccessivo danno da radicali liberi si può generare sia per un'aumentata formazione di questi composti, sia per una riduzione delle difese che fisiologicamente limitano gli effetti dannosi dei radicali stessi, sia ancora per un deficit dei meccanismi di riparazione del danno indotto da questi radicali, in genere invece ben efficienti. Questa differenziazione è importante, perché, dei tre meccanismi citati, solo il secondo, e parzialmente il primo, sono suscettibili di un reale miglioramento a seguito della somministrazione di antiossidanti (figura 17).

L'ipotesi di un coinvolgimento dei radicali liberi nel processo dell'invecchiamento è indirettamente confermata dall'osservazione della relazione inversa che lega l'attività metabolica delle varie specie animali con la loro durata media di vita; le specie metabolicamente più attive (nelle quali la produzione di radicali liberi è certamente maggiore), vivono infatti mediamente meno, o molto meno, delle specie metabolicamente più torpide.

I radicali liberi, d'altra parte, sono coinvolti in processi fisiologici basilari nella cellula. Lo stato redox cellulare controlla, per esempio, l'attivazione e la deattivazione di set di geni, eventualmente attraverso un'influenza su fattori di trascrizione,



(Figura 17)

come NFkB.

Lo stato redox cellulare, quindi, può svolgere effetti di controllo dello stato di attivazione cellulare anche nel "medio" periodo. Le attivazioni geniche innescate, infatti, possono spingere il loro effetto ben al di là della durata dell'alterazione dello stato ossidativo di per se'.

Al di là dell'effetto dello stress ossidativo sui fenomeni dell'invecchiamento cerebrale, esiste poi la dimostrazione di un ruolo di questi fenomeni nella genesi di alcune delle più importanti, e studiate, malattie degenerative cerebrali.

L'attivazione cellulare mediata da neuromediatrici con attività eccitatoria, inoltre, può condurre all'attivazione di canali ionici e di vie metaboliche a cascata che inducono un aumento della concentrazione endocellulare di radicali liberi, e di perossinitriti, cui si attribuisce oggi notevole importanza nei fenomeni degenerativi cerebrali.

Il glutammato, ad esempio, attiva mediante questi meccanismi la produzione di radicali liberi, e può così indurre morte cellulare attraverso numerosi meccanismi, tra cui l'apoptosi. L'uso concomitante di antiossidanti, in sistemi sperimentali, blocca questi fenomeni.

Anche la beta-amiloide, che costituisce uno dei meccanismi alla base del danno neuronale nella

## Antiossidanti, acido folico, creatina e sistema nervoso centrale: uno scenario in evoluzione

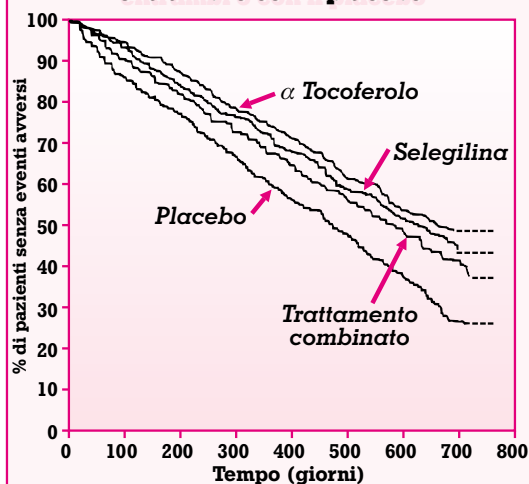
malattia di Alzheimer, svolge parte dei suoi effetti neurotossici attraverso fenomeni di carattere ossidativo. L'aggiunta di un antiossidante ad un modello sperimentale in cui viene valutata l'azione neurotossica dell'amiloide stessa, infatti, riduce l'effetto negativo di questa sostanza.

Uno studio di intervento specifico ha valutato se l'uso clinico di antiossidanti possa controllare questi fenomeni, ed ha mostrato che la somministrazione di alfa-tocoferolo a soggetti con iniziale malattia di Alzheimer riduce il rischio di deterioramento del quadro clinico, ed in particolare la frequenza di alcuni indicatori del quadro clinico stesso, quale l'istituzionalizzazione del paziente (figura 18).

Per quanto concerne l'uso di folati, va sottolineato come alcuni recenti lavori (Snowdon ed Hassing) documentino l'effetto dei folati stessi sui processi della memorizzazione (esistono a questo proposito anche alcuni dati italiani, ottenuti con dosi molto elevate di questi composti) e sul grado di atrofia della neocorteccia nella malattia di Alzheimer. Per quanto concerne invece la Creatina, due recenti lavori su modelli animali della Corea di Huntington, e su animali transgenici che incorrono in una patologia simile alla Corea di Huntington stessa, hanno dimostrato che questo composto è in grado di attenuare i processi di morte cellulare che conducono a questi quadri clinici. In conclusione, il nostro livello di conoscenza dei fenomeni che conducono all'invecchiamento cerebrale è in miglioramento, e la migliorata conoscenza di questi fenomeni rappresenta il fondamento di un loro più efficace controllo.

Gli interventi di carattere metabolico in questo settore, che trovano un razionale in un'ampia serie di dati di natura sperimentale e soprattutto, ma non esclusivamente, preclinica, potranno inoltre essere ulteriormente migliorati dallo studio dell'interazione tra specifici assetti genici e patologie cerebrali. Le accresciute conoscenze permetteranno nei prossimi anni di indirizzare gli interventi terapeutici in modo più mirato ed elettivo.

### Sopravvivenza senza eventi avversi di pazienti con malattia di Alzheimer trattati con Tocoferolo, Selegilina, entrambi o con il placebo



(Figura 18)

- ◆ *Un aumentato stress ossidativo è probabilmente coinvolto sia nei fenomeni dell'invecchiamento cerebrale, sia nella genesi di alcune delle più importanti malattie degenerative cerebrali come la malattia di Alzheimer.*
- ◆ *Uno studio controllato di intervento ha mostrato che la somministrazione di alfa-tocoferolo, un efficace antiossidante, a soggetti con iniziale malattia di Alzheimer, migliora l'evoluzione del quadro clinico in questi pazienti.*
- ◆ *Alcuni recenti lavori documentano un effetto positivo dei folati sui processi della memorizzazione e sul grado di atrofia della neocorteccia nella malattia di Alzheimer.*
- ◆ *Due recenti lavori su modelli animali della Corea di Huntington hanno dimostrato che la Creatina è in grado di attenuare i processi di morte cellulare che conducono a questo quadro patologico.*

# Il ruolo dell'integrazione nel mantenimento dello stato di salute del soggetto anziano

Gaetano Crepaldi (Università di Padova)

**L**a popolazione geriatrica è aumentata in modo consistente nel nostro Paese negli ultimi decenni. Si è incrementata in particolare la quota dei soggetti molto anziani (i cosiddetti "old-old"), che mostra un trend tuttora marcatamente crescente.

L'aumento del numero dei soggetti in età avanzata pone rilevanti problemi di natura sociale e sanitaria. Questi individui, per esempio, sono frequentemente sottoposti a terapie farmacologiche multiple, assumendo cronicamente da 5 a 10 farmaci per il controllo delle loro patologie principali. La compliance a questi trattamenti è inoltre bassa, e ciò è particolarmente vero per i farmaci impiegati nel controllo di tre importanti fattori di rischio coronarico, e cioè l'ipertensione, l'ipercolesterolemia ed il diabete.

In questo contesto l'uso di integratori alimentari può rappresentare una strategia alternativa da considerare, specie per quanto concerne gli interventi orientati a mantenere lo stato di salute.

L'interesse verso gli integratori alimentari è nato negli anni '60 negli Stati Uniti, dove un ampio movimento di opinione lanciò e diffuse l'idea che un'ottimizzazione delle strategie nutrizionali, che prevedesse anche l'uso di integratori (specie vitamine), potesse contribuire a migliorare, o a mantenere buono, lo stato di salute.

In Europa, l'interesse verso gli integratori è stato più tardivo, e si è diffuso negli anni '80.

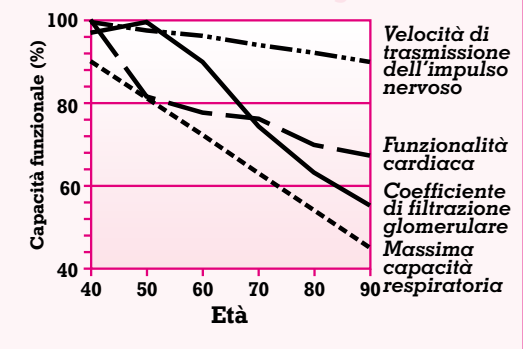
L'interesse per l'uso degli integratori nell'età avanzata è spiegabile con la fisiologia stessa dell'invecchiamento, caratterizzato dalla incapacità dell'organismo a mantenere l'omeostasi in condizioni di stress fisiologico, e da una maggiore vulnerabilità dell'individuo.

A partire dai 40 anni molte funzioni fisiologiche tendono infatti a declinare, anche se in modo quantitativamente diverso (figura 19).

La velocità di conduzione delle fibre nervose, per esempio, è ridotta di circa il 10%, in soggetti di 90 anni raffrontati a soggetti di 40 anni, mentre la capacità respiratoria massima si dimezza nello stesso intervallo di tempo. Anche la funzione glomerulare si riduce drasticamente oltre gli 80 anni, e ciò deve indurre ad attenzione nella somministrazione di sostanze farmacologiche o nutrizionali al soggetto anziano, che non è in grado di eliminarle agevolmente.

Passando a considerare alcune aree specifiche dell'integrazione nutrizionale, è opportuno sottolineare che molti minerali svolgono un ruolo im-

## Mutamenti, dovuti all'età, nell'efficienza di alcune funzioni fisiologiche umane



(Figura 19)

portante nell'organismo anziano, garantendo il mantenimento dell'equilibrio acido-base e la funzionalità di organi e tessuti vitali.

Il Calcio è per esempio essenziale per la solidità della struttura scheletrica, il Potassio per mantenere un'adeguata permeabilità delle membrane ad ioni e liquidi, il Magnesio per la funzionalità delle cellule nervose e muscolari, il Ferro ed il Rame per il loro ruolo antianemico (il Ferro è importante anche per il mantenimento dell'integrità della cute e degli annessi cutanei), il Selenio per il suo coinvolgimento nel controllo dei fenomeni ossidativi. Il deficit di queste sostanze è di particolare gravità nel soggetto anziano, ed ove rilevato va contrastato con gli interventi opportuni.

Un aspetto cruciale dell'invecchiamento, già ampiamente ricordato negli interventi precedenti di questo Simposio, è la ridotta efficienza, in età avanzata, dei meccanismi di difesa dai radicali liberi. Gli antiossidanti svolgono pertanto un ruolo potenziale di notevole interesse nell'anziano. Essi possono proteggere, come già ricordato, da malattie come l'arteriosclerosi, ma possono anche contribuire a limitare il rischio di incorrere in malattie neoplastiche ed a stimolare i fenomeni immunitari di natura difensiva.

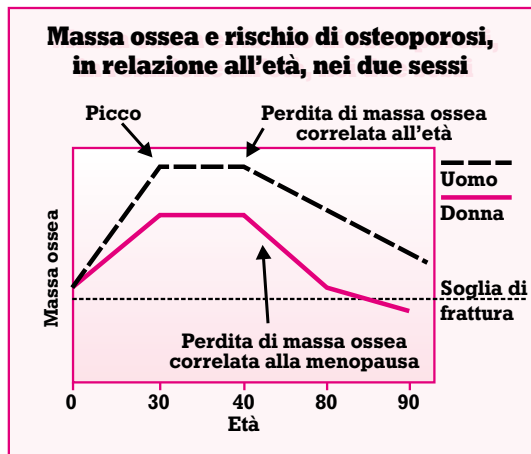
Nell'anziano è inoltre spesso presente una sindrome a tutt'oggi non completamente compresa e definita, denominata "failure to thrive". È un quadro complesso, caratterizzato da scarso appetito, perdita di peso, aumento della dipendenza, in assenza di cause ovvie di queste condizioni; essa contribuisce in modo determinante alla cosiddetta "fragilità" dell'anziano. In questa condizione un uso intelligente di integratori alimentari può svolgere un ruolo importante.

## Il ruolo dell'integrazione nel mantenimento dello stato di salute del soggetto anziano

Le patologie degenerative dell'anziano sono numerose, e molte di esse possono essere influenzate mediante appositi interventi.

E' possibile per esempio ridurre il rischio di osteoporosi e di fratture, o di malattie cardiovascolari, o controllare adeguatamente la malattia diabetica, mentre meno agevole è influenzare il decorso dell'artrosi (una delle patologie più prevalenti in età avanzata), dei disturbi sensoriali e di tipo cognitivo.

L'osteoporosi è, sul piano storico, un problema relativamente recente, perché nei millenni passati l'apporto alimentare di Calcio era tale da generare, verso i 30 anni, una massa ossea più che adeguata; la limitata durata della vita media, inoltre, faceva sì che il raggiungimento della soglia di frattura, per la perdita di massa ossea senile, fosse poco probabile. Attualmente la situazione si è notevolmente modificata: l'apporto di Calcio, come si ricordava nella prima relazione di questo Simposio, è mediamente insufficiente, e la maggior parte delle donne italiane giunge così, tra i 60 e gli 80 anni, in prossimità della soglia teorica di frattura (figura 20).



(Figura 20)

L'integrazione dietetica con Calcio e vitamina D3 è quindi da utilizzare con larghezza nella prevenzione di questa patologia. Un grammo di Calcio al dì e 400 UI di vitamina D3, in particolare, sono efficaci nella prevenzione delle fratture secondo alcuni studi controllati.

La Fosfatidilserina, di cui si è già discusso in dettaglio, dispone di un importante supporto di studi clinici, 16 dei quali controllati, che ne suggeriscono un ruolo nella prevenzione del decadimento cognitivo. Gli effetti di questa sostanza sono positivi e documentabili, in particolare, sull'attenzione, sulla concentrazione, sulle reazioni motorie, sulla funzione dell'asse ipotalamo-ipofisi, sui cicli circa-

diani del TSH. Il suo uso ha quindi un preciso razionale nel soggetto in età avanzata.

Un'altra importante area di impiego degli integratori, ed in particolare della vitamina C, è la prevenzione della cataratta, che rappresenta nel nostro Paese la principale causa di ospedalizzazione per motivi chirurgici. Uno studio condotto presso la Tuft University, su donne di età compresa tra 56 e 71 anni che hanno assunto per almeno 10 anni da 400 ad 800 mg/die di vitamina C, ha mostrato che queste donne hanno un rischio ridotto del 77%, rispetto alla popolazione di controllo, di sviluppare questa patologia. Meno chiari sono invece i dati relativi al ruolo degli antiossidanti nella prevenzione della degenerazione maculare (che rappresenta a sua volta la prima causa di cecità nel nostro Paese), anche se qualche interessante dato preliminare su questo argomento è già disponibile. Alcuni trial mirati su questo tema sono in corso, e forniranno probabilmente informazioni definitive.

Gli interventi ricordati, ed i molti altri possibili, se effettuati in modo razionale, possono in conclusione permettere di allungare la durata della vita attiva dell'anziano, e presentano quindi un evidente interesse medico. E' peraltro essenziale che le informazioni sui loro effetti siano sempre più basate sull'evidenza sperimentale, come ormai si deve richiedere ad ogni intervento preventivo o terapeutico da utilizzare nella nostra società.

- ◆ *Nell'anziano è frequente una sindrome caratterizzata da scarso appetito, perdita di peso, aumento della dipendenza, che contribuisce in modo determinante alla cosiddetta "fragilità" dell'anziano. In questa condizione un uso intelligente di integratori alimentari può svolgere un ruolo importante.*
- ◆ *L'integrazione dietetica con Calcio e vitamina D3 è da utilizzare con larghezza nella prevenzione dell'osteoporosi tra i soggetti anziani. L'uso combinato di queste sostanze è infatti efficace nella prevenzione delle fratture secondo alcuni studi controllati.*
- ◆ *Secondo uno studio condotto negli Stati Uniti, il rischio di sviluppare cataratta è ridotto di quasi l'80% tra le donne che avevano assunto per almeno 10 anni 400-800 mg/die di vitamina C, rispetto alla popolazione di controllo.*
- ◆ *Numerosi studi clinici suggeriscono un ruolo preciso per la Fosfatidilserina nella prevenzione del decadimento cognitivo, e dei disturbi dell'attenzione, della concentrazione e della memorizzazione nel soggetto anziano. Il suo uso ha quindi un preciso razionale in questi soggetti.*

# BIBLIOGRAFIA SELEZIONATA

---

- Bessman SP et al. **Phosphocreatine, exercise, protein synthesis, and insulin.** In: **Guanidino compounds in biology and medicine.** Eds. PP De Deyn, B Marescau, V Stalon, IA Quareshi, John Libbey & Company Ltd. 1992; pag. 181
- Blokland A et al. **Cognition enhancing properties of subchronic phosphatidylserine (PS) treatment in middle-aged rats: Comparison of bovine cortex PS with egg PS and soybean PS.** *Nutrition* 1999; 15: 1978-1995
- Buring JE, Hennekens CH eds. **Antioxidants and coronary heart disease: weighing the totality of the evidence.** *J Cardiovasc Risk* (Special issue) Vol. 3, 1996
- Claro FT et al. **Bovine brain phosphatidylserine attenuates scopolamine-induced amnesia.** *Physiol Behav* 1999; 67: 551-554
- Coggan AR et al. **Muscle metabolism during exercise in young and older untrained and endurance-trained men.** *J Appl Physiol* 1993; 75: 2125-2130
- Greenberg ER et al. **Mortality associated with low plasma concentration of  $\beta$ -Carotene and the effect of oral supplementation.** *J Am Med Assoc* 1996; 275: 699-703
- Halliwell B **Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept.** *Nutrition Reviews* 1999; 57, 104-110
- Kidd PM **Phosphatidylserine; membrane nutrient for memory. A clinical and mechanistic assessment.** *Alt Med Review* 1996; 1: 70-84
- Macdonald AJD **ABC of mental health: Mental health in old age.** *Brit Med J* 1997; 315: 413-417
- Naiko M et al. **Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme family protease activation during apoptosis.** *Blood* 1997; 6: 2060-2066
- Pepeu G **The phosphatidylserine story** (Editorial) *Nutrition* 1999; 15: 789
- Pepeu G et al. **A review of phosphatidylserine pharmacological and clinical effects. Is phosphatidylserine a drug for the ageing brain ?** *Pharmacol Res* 1996; 33: 73-80
- Perrig WJ et al. **The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old.** *J Am Geriatr Soc* 1997, 45: 718-724
- Rimm EB et al. **Folate and Vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of Coronary Heart Disease among women.** *J Am Med Assoc* 1998; 276: 359-364
- Ruggeri P **Ruolo fisiologico della creatina nei meccanismi della contrazione muscolare.** *Geriatrics* 1997; 9: 221-226
- Russell TM et al. **Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease.** *J Neurosci* 1999; 18: 156-163
- Tribble D **Antioxidant consumption and risk of Coronary Heart Disease: Emphasis on Vitamin C, Vitamin E and beta carotene. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association.** *Circulation* 1999; 99: 591-595
- Vermeulen EGJ et al. **Effect of homocysteine-lowering with folic acid plus Vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: A randomised, placebo-controlled trial.** *Lancet* 2000; 355: 517-522.
- Walliman T et al. **The subcellular compartmentation of creatine kinase isozymes as a precondition for a proposed phosphoryl-creatine circuit.** *Prog Clin Biol Res* 1990; 344: 877-881
- Yatin SM et al. **Temporal relations among amyloid beta-peptide-induced free-radical oxidative stress, neuronal toxicity, and neuronal defensive responses.** *J Molec Neurosci* 1998; 11: 183-197