

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Morbo di Parkinson:
biomonitoraggio degli elementi chimici
e del danno ossidativo**

Alessandro Alimonti, Beatrice Bocca,
Giovanni Forte, Anna Pino, Flavia Ruggieri
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
05/23

Istituto Superiore di Sanità

Morbo di Parkinson: biomonitoraggio degli elementi chimici e del danno ossidativo.

Alessandro Alimonti, Beatrice Bocca, Giovanni Forte, Anna Pino, Flavia Ruggieri

2005, 47 p. Rapporti ISTISAN 05/23

L'eziologia del morbo di Parkinson non è ancora del tutto chiara, ma è accertato che diversi fattori sono coinvolti nel rischio dell'insorgenza della malattia. Tra questi possiamo citare tossine esogene quali i metalli. Questo studio valuta le concentrazioni di Al, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Si, V e Zn in fluidi e tessuti (sangue, siero, liquido cerebrospinale e capelli) di pazienti affetti da morbo di Parkinson e di soggetti di controllo. Sono state esplorate eventuali correlazioni tra alterazioni nel contenuto dei metalli e parametri clinici dei pazienti. È stata anche valutata la presenza di danno ossidativo e l'entità della capacità antiossidante nella patologia.

Parole chiave: Morbo di Parkinson, Elementi, Danno ossidativo, Biomonitoraggio

Istituto Superiore di Sanità

Parkinson's disease: bio-monitoring of the chemical elements and oxidative damage.

Alessandro Alimonti, Beatrice Bocca, Giovanni Forte, Anna Pino, Flavia Ruggieri

2005, 47 p. Rapporti ISTISAN 05/23 (in Italian)

The aetiology of the Parkinson's disease is still unclear, but it is accepted that different factors may play a role in the development of this neuropathology. Among them, exogenous toxins such metals are suggested. This study describes the levels of Al, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Si, V and Zn in biological fluids and tissues (blood, serum, cerebrospinal fluid and hair) of patients affected by Parkinson's disease and in control subjects. Possible correlations between metal unbalances and clinical parameters of the patients were investigated. Oxidative damage and anti-oxidant capacity in the pathology were also reported.

Key words: Parkinson's disease, Chemical elements, Oxidative damage, Bio-monitoring

Si ringrazia il prof. Giuseppe Sancesario del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università Tor Vergata di Roma, senza il cui supporto professionale la realizzazione di tale studio non sarebbe stata possibile.

Lo studio è parte del progetto NEUROTOX finanziato dal Ministero della Salute (contratto 1AB/F, 2002-2004).

Per informazioni su questo documento scrivere a: alessandro.alimonti@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2005

INDICE

Introduzione	1
Fattori eziologici	3
Possibili cause ambientali	3
Fattori genetici	4
Altre potenziali concause	4
Patogenesi	5
Stress ossidativo	5
Ruolo degli elementi chimici	8
Alluminio	9
Cadmio	9
Calcio	9
Cromo	10
Ferro	10
Magnesio	11
Manganese	11
Mercurio	12
Piombo	12
Rame	13
Zinco	13
Altri metalli	14
Metodologie di sperimentazione e monitoraggio	15
Metodi	15
Popolazione	15
Campionamento, conservazione e trattamento preanalitico	15
Analisi degli elementi chimici	17
Determinazione dello stato ossidativo	18
Valutazione statistica	19
Risultati	20
Prestazioni dei metodi analitici	20
Variazione degli elementi chimici con la malattia	22
Fluidi cerebrospinali	22
Siero	24
Sangue	27
Capelli	31
Valutazione dello stress ossidativo	32
Evidenze presenti in letteratura	34
Conclusioni	37
Bibliografia	38

INTRODUZIONE

Il Morbo di Parkinson idiopatico (MP) è una sindrome extrapiramidale caratterizzata da rigidità muscolare, tremore e bradicinesia. La rigidità muscolare deriva dalla resistenza al movimento passivo che è presente tanto nei muscoli flessori quanto in quelli estensori. Il tremore è di tipo statico perché si manifesta a riposo, si esalta negli stati di ansia e si riduce o scompare del tutto durante l'esecuzione del movimento o durante il sonno. La bradicinesia è caratterizzata dalla difficoltà ad iniziare o terminare un particolare movimento. Tutto ciò, si risolve in disturbi dell'equilibrio, andatura impacciata e postura curva. Le sindromi parkinsoniane, sebbene caratterizzate da somiglianza clinica all'MP, se ne distinguono per l'eterogeneità eziologica e per i criteri clinico-patologici necessari per la diagnosi. Esistono differenti tipi di parkinsonismi atipici:

- a) iatrogeni, indotti da neurolettici o da antagonisti della dopamina;
- b) neurotossici (come quelli indotti da 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina, MPTP);
- c) genetici (PARK1 e PARK2);
- d) quelli che comprendono la Paralisi Sopranucleare Progressiva (PSP), l'Atrofia Sistemica Multipla (ASM) e la demenza con i corpi di Lewy.

A livello epidemiologico, l'incidenza dell'MP è 10 volte maggiore di quella dei parkinsonismi atipici nel loro insieme. L'MP è un disturbo dell'età media o avanzata con un'incidenza maggiore negli uomini, che varia da 4,5 a 21 casi l'anno per 100.000 (interessa circa il 10% dei soggetti al di sopra dei 65 anni), con una progressione graduale e un decorso prolungato (1).

La malattia ha un substrato anatomico-patologico di degenerazione neuronale della zona compatta della sostanza nera (*Substantia Nigra pars compacta*, SNpc) nel mesencefalo dorsale e di altri nuclei pigmentati del tronco encefalico, come il *Locus Coeruleus* (LC). Una diagnosi accurata è possibile osservando in analisi *post-mortem* l'alterazione istopatologica di inclusioni citoplasmatiche sferiche e ialine con una parte centrale densa eosinofila circondata da un contorno pallido, detti corpi di Lewy. È stato dimostrato che i costituenti principali dei corpi di Lewy sono l'ubiquitina e una forma mutata della proteina α -sinucleina, quest'ultima prodotta a seguito di un difetto genetico che può essere trasmesso mediante un meccanismo autosomico dominante (1).

Da un punto di vista biochimico, a livello della SNpc di soggetti parkinsoniani sono state accertate una riduzione della quantità di dopamina (2), una perdita della pigmentazione caratteristica (minor concentrazione di neuromelanina), una riduzione dell'attività del complesso I della catena respiratoria mitocondriale e una minore attività dell' α -chetoglutarato deidrogenasi (1).

Inoltre, la presenza di elevati livelli di ioni ferrosi e ferrici non legati alla ferritina insieme ad una consistente riduzione della quantità di glutatione in forma ridotta (GSH) non accompagnata da un aumento di concentrazione della forma ossidata (GSSG) indicano un'intensa situazione di stress ossidativo (1).

Sebbene l'eziologia dell'MP sia ancora sconosciuta è ormai accettata l'ipotesi di un'origine multifattoriale in cui interagiscono componenti ambientali e genetiche (3, 4). Sono stati proposti, nel corso degli anni, diversi fattori eziologici: ereditarietà (5), lesioni cerebrali (6), infezioni (7), neurotossine endogene (8, 9), fattori ambientali (10) e alterate espressioni geniche (11).

L'eziogenesi multifattoriale è, quindi, l'aspetto caratterizzante dell'MP. Parametri quali l'invecchiamento, la suscettibilità biologica e fattori ambientali sembrano essere coinvolti anche

se non in modo del tutto chiaro. In situazione fisiologiche l'insorgere di gradienti di metalli nell'SNC è limitato da efficienti meccanismi omeostatici *in loco*, dalla presenza di una barriera emato-encefalica solo in parte permeabile e dalla richiesta di energia da parte dei sistemi di trasporto dei metalli. L'alterata omeostasi di alcuni di questi metalli può risultare, quindi, citotossica, con un quadro spesso caratterizzato dal danno ossidativo.

In questo ambito, sono stati confrontati i livelli di elementi neurotossici nei fluidi e tessuti corporei (sangue, siero, CSF e capelli) di pazienti MP con gruppi di controllo. Ciò al fine di incrementare le conoscenze su questi potenziali cofattori ambientali ed evidenziare un eventuale significato predittivo-diagnostico di possibili squilibri nel contenuto di elementi. Inoltre, allo scopo di valutare il ruolo dello stress ossidativo come un *marker* della patologia, sono state valutate, nei campioni di siero, sia la presenza di specie ossidative, che la capacità antiossidante.

FATTORI EZIOLOGICI

Possibili cause ambientali

Studi epidemiologici indicano che alcuni fattori ambientali e occupazionali possono aumentare il rischio d'insorgenza della malattia. Questi includono l'esposizione a tossine esogene quali pesticidi (Paraquat), metalli (Al, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Zn), altri xenobiotici (es. il monossido di carbonio) e prodotti chimici industriali (MPTP, solventi organici), stile di vita (dieta e fumo), luogo di residenza (ambiente rurale) e attività professionale (lavoro agricolo) (12).

Molti studi mostrano una correlazione positiva fra l'MP e l'esposizione sia acuta che cronica a pesticidi (13, 14). L'esposizione a erbicidi, insetticidi e fungicidi avviene attraverso l'assunzione di acqua e cibo contaminato, per contatto cutaneo o attraverso inalazione diretta. Sono stati proposti diversi meccanismi con cui i pesticidi esplicano la loro tossicità: alcuni inducono disfunzione mitocondriale inibendo il complesso I (15, 16), altri modulano gli enzimi come la citocromo P450 e la glutazione transferasi (17, 18), altri ancora causano tossicità attraverso un meccanismo sinergico (19).

Per quanto riguarda i metalli, Gorell *et al.* riportano un'associazione significativa fra Mn e Cu per soggetti con più di 20 anni di esposizione occupazionale (20). Inoltre, esposizioni croniche a combinazioni di Fe e Cu, Pb e Cu, Pb e Fe costituiscono un rischio maggiore di sviluppare l'MP che non l'esposizione al singolo metallo (21). Rybicki *et al.* trovano che l'esposizione occupazionale a Cu, Fe o Pb incrementa il rischio in soggetti con storia familiare positiva (22). Anche Zayed *et al.* riscontrano associazioni tra MP ed esposizioni occupazionali a Al, Fe e Mn protratte per più di 30 anni (23).

Un recente studio ha dimostrato che la contemporanea presenza di specifici pesticidi e metalli, come il dietilditiocarbammato e Al^{3+} , è in grado di indurre un cambiamento conformazionale dell' α -sinucleina e accelerare il fenomeno di aggregazione in fibrille che porta alla formazione dei corpi di Lewy (24). L'associazione tra MP, il luogo di residenza e/o l'attività professionale è spesso considerata il risultato dell'esposizione a vari composti chimici usati in agricoltura. Infatti, gli agricoltori e le persone che vivono in ambienti rurali in generale sono stati trovati esposti a vari pesticidi a livelli più alti del normale (25, 26). Metzler, ad esempio, suggerisce una dipendenza tra l'MP e l'ingestione di pesticidi rilasciati dal suolo nell'acqua potabile (27).

È stato suggerito che le differenti abitudini alimentari possono influire sulla variabilità geografica dell'MP. L'assunzione di cibi ricchi di grassi animali, sia saturi che insaturi (28) e di vitamina D incidono positivamente sullo sviluppo della malattia (29). Mentre l'assunzione di frutta, verdura, pane, carne o cibi contenenti le vitamine A, C ed E non è correlata in alcun modo coll'MP. Altri alimenti, quali noci (30), legumi (31), patate (32) e caffè (33) sembrano svolgere, invece, un ruolo protettivo.

Studi epidemiologici dimostrano un'associazione inversa tra il fumo di sigaretta e l'insorgenza dell'MP (34, 35). A tal riguardo, sono stati evidenziati diversi meccanismi con cui la nicotina potrebbe avere un ruolo protettivo: stimolare il rilascio di dopamina (36), stimolare direttamente i recettori nicotinici presinaptici, inibire enzimi come la monoammino-ossidasi e preservare i neuroni nigrali da metaboliti tossici prodotti enzimaticamente (37).

È stata, anche, dimostrata una correlazione con composti chimici, come l'MPTP, che è in grado di indurre neurotossicità attraverso la sua conversione, mediata dalla monoammino-ossidasi-B, a ione piridinio (MPP^+) il quale blocca l'attività del complesso I mitocondriale,

all'interno dei neuroni dopaminergici, causando una patologia con manifestazioni identiche all'MP (38).

Fattori genetici

Circa il 5-10% dei pazienti colpiti da MP soffrono di una forma familiare della malattia e mostrano un modello di ereditarietà autosomica dominante. Una storia familiare positiva può aumentare la probabilità di insorgenza dell'MP (1) e, in particolare nei gemelli, i fattori genetici appaiono essere importanti quando la malattia insorge prima dei 50 anni di età (39).

In uno studio effettuato su una famiglia italo-americana, con inizio precoce della malattia (prima dei 50 anni), è stato ipotizzato il coinvolgimento della regione q21-23 del cromosoma 4 (40). Successivamente si è visto che la presenza di due mutazioni del gene per l' α -sinucleina sono sufficienti a determinare un fenotipo parkinsoniano: la sostituzione di una Alanina con una Treonina in posizione 53 (Ala53Thr) (confermata nell'85% degli MP familiari) (41) e la sostituzione di una Alanina con una Prolina in posizione 30 (Ala30Pro) (42).

Altre potenziali concause

Diversi studi suggeriscono che alcune patologie infettive – come l'encefalite indotta dal virus Coxsackie B (43), l'influenza A (44), il morbillo (45), l'herpes (46), l'AIDS (47) e la parotite epidemica (48) – possono essere temporaneamente associate a parkinsonismi, sebbene in altri studi è stato possibile identificare agenti virali specifici per l'MP (49). Takahashi *et al.* hanno dimostrato che l'inoculazione intracerebrale del virus per l'influenza A nei topi ha come bersaglio maggiore la SN (50), mentre Tsui *et al.* ha evidenziato una correlazione con la probabilità di infezioni virali del tratto respiratorio dei lavoratori delle scuole o degli ambienti sanitari (51). È stato anche mostrato un legame fra le infezioni avvenute durante l'infanzia accompagnate da febbre reumatica e laringite difterica e il successivo sviluppo dell'MP durante la vita (52).

Alcuni studi epidemiologici hanno focalizzato l'attenzione su fattori demografici e passate esperienze di vita. Ad esempio, l'MP è stato correlato con lesioni cerebrali nel caso in cui il trauma sia stato accompagnato da emorragia (53-55). Inoltre nei pazienti in cui il trauma è accompagnato da tremore, si è ottenuta una risposta positiva alla terapia con L-Dopa (12). È stato anche riferito lo sviluppo di sindromi parkinsoniane in ex-pugili che presentavano diminuzione neuronale nel *globus pallidus* e nel *putamen*, ma non nello striato, evidenziando, quindi, una distinzione tra queste forme e l'MP (56). Al momento non è ancora chiaro se il trauma cerebrale possa essere considerato come un fattore eziologico: i dati ottenuti, infatti, richiedono cautela nell'interpretazione sia per le differenti definizioni di trauma, sia per i diversi criteri di accertamento e diagnosi di MP (12).

PATOGENESI

Stress ossidativo

I neuroni dopaminergici sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo perché la dopamina è metabolizzata in perossido di idrogeno (H_2O_2) e altre specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) (57-59) quali il radicale superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale ossidrilico ($\text{OH}^{\cdot}$) e l'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$) (60) che possono portare all'alterazione di una varietà di molecole biologiche (DNA, proteine e lipidi). Nei neuroni la DA può essere metabolizzata sia dalla monoammino-ossidasi in 3,4-diidrossifenilacetaldeide (3,4-DHPA) e ammoniaca che, per auto-ossidazione non enzimatica, in radicale semichinone ($\text{SQ}^{\cdot}$) secondo le reazioni:

1. $\text{DA} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3,4 \text{ DHPA} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$
2. $\text{DA} + \text{O}_2 \rightarrow \text{SQ}^{\cdot} + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+$
 $\text{DA} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{SQ}^{\cdot} + \text{H}_2\text{O}_2$

L' H_2O_2 e l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ sono normalmente eliminati da reazioni enzimatiche coinvolgenti le SuperOssido Dismutasi (SOD), la Glutazione PerOssidasi (GPO) e le catalasi. Una concentrazione costante di H_2O_2 accompagnata da un aumento significativo di Fe^{+2} può portare alla reazione di Fenton con formazione del radicale $\text{OH}^{\cdot}$.

È stato dimostrato che la neuromelanina (NM), sito di accumulo-riduzione del ferro nella SN, può incrementare la produzione del radicale ossidrilico, legare i metalli come il Fe, promuoverne la riduzione e generare, quindi, lo stato di valenza utile per la reazione di Fenton (61) o la reazione di Haber-Weiss. Questi processi catalitici possono richiedere l'intervento di specie endogene riducenti, quali altri metalli di transizione (Cu e Mn) oltre alla neuromelanina (62).

I mitocondri sono una notevole sorgente di ROS, circa l'1-2% dell'ossigeno metabolizzato viene convertito in $\text{O}_2^{\cdot-}$ da diversi siti nella catena respiratoria e nella matrice mitocondriale. Altre vie metaboliche specifiche inoltre portano alla formazione di specie reattive dell'azoto (*Reactive Nitrogen Species*, RNS), direttamente implicate nella neurodegenerazione. Infatti, l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ può reagire con il radicale ossido nitrico ($\text{NO}^{\cdot}$) formando agenti ossidanti altamente reattivi, il perossinitrito (ONOO^-) e il radicale idrossido ($\text{OH}^{\cdot}$).

Tali specie, oltre a causare danno ossidativo, inibiscono la funzione mitocondriale inducendo il rilascio di aminoacidi eccitatori come il glutammato e l'aspartato, i quali, a loro volta, provocano un aumento del Ca^{+2} libero nel citosol, portando ad una serie di eventi che scatenano una degenerazione neuronale (Figura 1) attraverso:

1. attivazione dell'ossido nitrico sintetasi (*Nitric Oxide Synthetase*, NOS) che genera $\text{NO}^{\cdot}$ dall'arginina;
2. attivazione della proteasi che converte la xantina deidrogenasi in xantina ossidasi, la quale a sua volta catalizza l'ossidazione della xantina in acido urico e $\text{O}_2^{\cdot-}$;
3. attivazione della fosfolipasi (PLA_2) che rilascia acido arachidonico, il quale si decompone formando l' $\text{O}_2^{\cdot-}$.

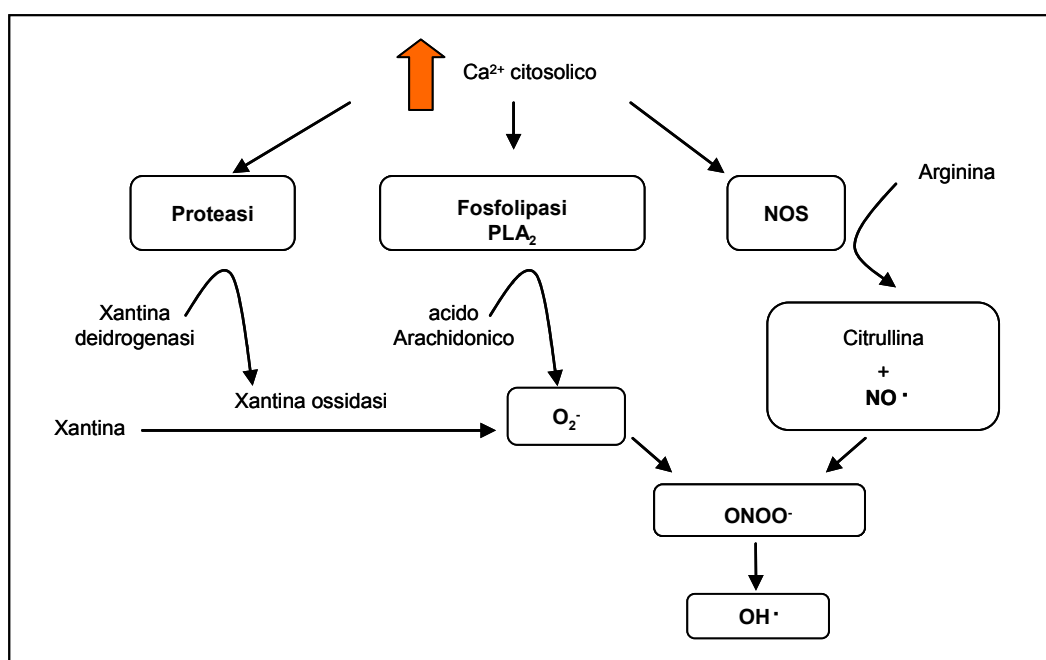


Figura 1. Schema degli effetti del Ca^{+2} citosolico nella degenerazione neuronale

Il punto cruciale è il danno provocato dalla NOS neuronale; infatti la formazione del radicale ossido nitrico ($\text{NO}^\bullet$) determina:

1. alterazione della funzione mitocondriale;
2. alterazione dell'omeostasi cellulare;
3. danno al DNA e ai lipidi;
4. aumento della concentrazione di Fe libero responsabile del danno ossidativo.

Il $\text{NO}^\bullet$ è assente nella SN, mentre nello striato si ritrova in una popolazione specifica di neuroni con elevata densità. È, quindi, un fattore neurotossico specifico dello striato, che comporta degenerazione dei neuroni della SN (63).

L'ossido nitrico può facilmente diffondere attraverso le membrane cellulari ma, a differenza dei più comuni neurotrasmettitori e neuropeptidi, non può essere immagazzinato e riciclato da meccanismi di recupero nei terminali sinaptici. È stato supposto, perciò, che il $\text{NO}^\bullet$ possa agire senza il bisogno di meccanismi normalmente associati con il rilascio e il recupero degli altri neurotrasmettitori e senza il bisogno di connessioni sinaptiche convenzionali (64). Per questo, è stata avanzata l'ipotesi che i neuroni contenenti la NOS abbiano caratteristiche morfologiche distintive e siano in grado di creare connessioni sinaptiche con altri neuroni.

Tecniche di immunocitochimica sui neuroni nitrinergici hanno evidenziato un meccanismo retrogrado secondo cui la NOS funziona da sinapsi terminale fra un terminale eccitatorio glutammanergico e una spina dendritica post-sinaptica dopaminergica, connettendo entrambi i complessi in modo da modulare l'effetto del terminale eccitatorio sulla spina post-sinaptica (Figura 2).

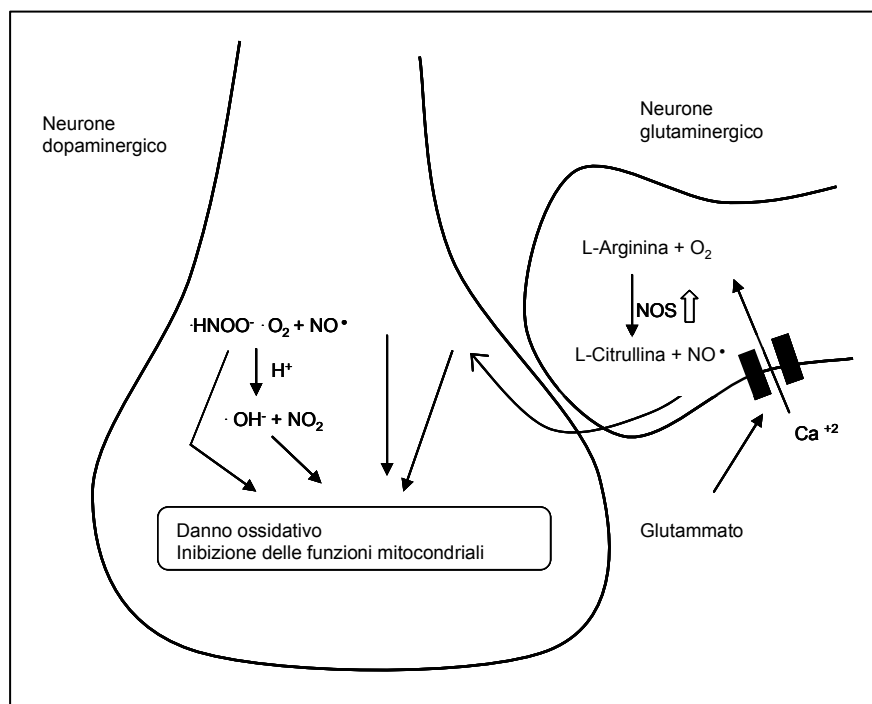


Figura 2. Neurotossicità mediata dall'ossido nitrico nell'MP

Per valutare lo stato ossidativo dell'organismo possono essere seguiti due differenti approcci:

1. valutare il danno cellulare tramite misura dei radicali (ROS e RNS) o mediante la determinazione dei metaboliti che si formano durante i processi cui partecipano i radicali;
2. verificare la capacità di difesa contro gli agenti ossidanti per mezzo della misura degli antiossidanti naturali (vitamine, acido urico), degli enzimi (GPO, SOD e catalasi) e dei loro substrati (GSH e GSSG).

I radicali causano danno a diversi tipi di molecole biologiche: proteine, lipidi e DNA. Una conseguenza dell'eccessiva produzione dei ROS nel cervello è la perossidazione dei fosfolipidi e acidi grassi polinsaturi liberi. Il danno provocato si risolve in un'alterazione della struttura e funzione del doppio strato fosfolipidico delle membrane plasmatiche e degli organelli citoplasmatici. Un modo per misurare l'indice di perossidazione lipidica nella SNpc consiste nel valutare i livelli dei prodotti di questo processo. La perossidazione lipidica dell'acido arachidonico legato alle membrane rilascia una serie di aldeidi tra cui la malondialdeide (MDA) e il 4-idrossi-2-nonenale (HNE). Gli elevati livelli di questi prodotti, riscontrati nella SNpc dei pazienti parkinsoniani, confermano la situazione di intenso stress ossidativo. Inoltre il loro incremento (fino a quattro volte) riscontrato anche nel fluido cerebrospinale (*CerebroSpinal Fluid*, CSF) suggerisce un parallelo incremento nel cervello (65, 66). È stato anche dimostrato che il HNE e la MDA sono composti elettrofili in grado di reagire con i residui di His, Lys e Cys provocando, nelle proteine solubili cellulari, l'introduzione di gruppi carbonilici (CO) utili per la valutazione ossidativa (66-68). L'elevata produzione di radicali inibisce anche l'attività dei meccanismi di riparo del DNA dei neuroni nigrostriatali dopaminergici. In tal caso è stato osservato che i radicali sono in grado di idrossilare in posizione C-8 i residui guanosinici del DNA, producendo la 8-idrossi-deossiguanosina: ne è stato evidenziato l'incremento in analisi *post-mortem* di pazienti parkinsoniani (69).

Ruolo degli elementi chimici

L'MP è risultato associato ad esposizioni ambientali od occupazionali a metalli, ad una loro assunzione attraverso la dieta e ad un'alterata distribuzione di quelli presenti fisiologicamente (70). Come precedentemente riportato diversi autori suggeriscono l'esposizione occupazionale ai metalli come uno dei principali co-fattori di rischio (12, 21, 23, 71).

Altri autori hanno anche dimostrato che le abitudini alimentari non soltanto possono contribuire all'aumento di alcuni metalli nell'organismo, ma, talvolta, ne esaltano la tossicità con meccanismi sinergici, accentuando il danno al tessuto celebrale come nel caso di Fe e Mn (72).

Inoltre, il coinvolgimento di alcuni metalli (Cu, Fe e Mn) nella produzione dei radicali liberi, li rende direttamente responsabili della degenerazione della SN (Figura 3) (70).

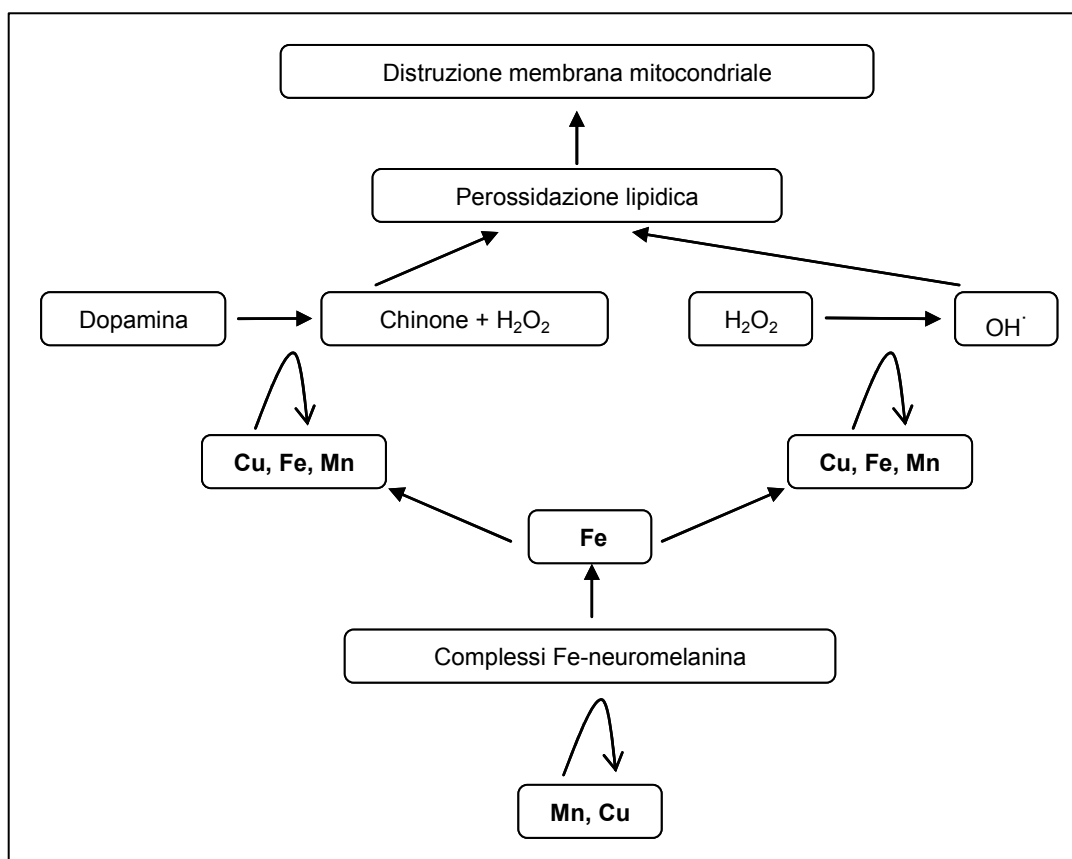


Figura 3. Schema di un possibile meccanismo attraverso cui Fe, Mn e Cu portano ad un aumento della formazione di radicali liberi e al conseguente danno della membrana mitocondriale

Altri studi riportano che elementi quali Al, Cd, Co, Cu, Mn e Fe sono in grado di favorire la produzione delle inclusioni citoplasmatiche caratteristiche dell'MP, i corpi di Lewy (24, 73).

Di seguito vengono trattati in modo più dettagliato i metalli (Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Pb e Zn) che, allo stato attuale delle conoscenze, sembrano poter assumere un ruolo nella malattia.

Alluminio

È conosciuta da molto tempo la tossicità di Al nei confronti di sistemi scheletrici, neurologici ed ematologici (74). La presenza di Al nell'organismo è normalmente molto scarsa suggerendo che l'accumulo intraneuronale sia dovuto principalmente a risorse esogene. L'Al può entrare nei tessuti cerebrali attraverso il flusso sanguigno. È stato dimostrato che la specie più abbondante nel plasma, l'Al-transferrina, è in grado di attraversare la barriera-ematoencefalica con un meccanismo di endocitosi mediato dal recettore per la transferrina stessa (75).

Sono stati riportati elevati livelli di Al nelle neurofibrille dei neuroni della corteccia cerebrale di pazienti con MP (76). Sebbene l'Al non svolga nessun ruolo fisiologico, non partecipi a reazioni redox e non sembri promuovere la formazione di radicali liberi, è, comunque, in grado di rafforzare il danno ossidativo indotto dal Fe. È stato, infatti, dimostrato che i sali di Al in combinazione con il Fe sono in grado di aumentare la perossidazione lipidica (77) e che la coppia Al^{3+}/Fe può aumentare la produzione del radicale $OH^{\bullet}$ stimolando l'autossidazione della 6-idrossidopamina (6-OHDA) (78). Inoltre, anche se il meccanismo non è noto, Bolla *et al.* riportano un'associazione fra la presenza di Al e la riduzione del metabolismo del glucosio nelle aree corticale e striatale, con inibizione di sintesi di neurotrasmettitori come l'acetilcolina (79).

Cadmio

Il Cd si accumula soprattutto in fegato, reni, cervello, cuore e polmoni (80, 81) e interferisce con i segnali intracellulari e con la regolazione genica a diversi livelli (82). È stato riportato che Cd interferisce con l'attività di enzimi antiossidanti come la SOD (83) e la catalasi (84). La sua tossicità si evidenzia principalmente a livello epatico e a livello di alterazioni neurochimiche del Sistema Nervoso Centrale (SNC), causando, ad esempio, formazione dei ROS e perossidazione lipidica delle membrane (84, 85). Non è conosciuto il meccanismo specifico con cui il Cd causa la formazione di radicali liberi, è chiaro, però, che avendo un singolo stato di valenza (Cd^{2+}) non è in grado di partecipare a reazioni con meccanismo simile a quello di Fenton (86). Wang *et al.* ipotizzano un meccanismo in cui l'inibizione del complesso III della catena di trasporto mitocondriale comporta il blocco del trasferimento elettronico e l'accumulo del semiubichinone, il quale, essendo instabile a sua volta, cede un elettrone all'ossigeno molecolare con formazione di $O_2^{\bullet-}$ (87). Modelli animali rivelano che il Cd induce degenerazione dei gangli basali in associazione con disfunzioni comportamentali come iperattività e perdita dell'equilibrio (88). Inoltre, iniezioni di Cd producono alterazioni in neurotrasmettitori come serotonina e acetilcolina (89). Come per molti altri elementi, la sua correlazione con la neurodegenerazione è evidente in situazioni di esposizione acuta: è stato riportato ad esempio che l'intossicazione acuta da Cd in lavoratori addetti alla saldatura comporta la manifestazione di sintomi parkinsoniani (90).

Calcio

Alterazioni dell'omeostasi neuronale del Ca o dei processi Ca-dipendenti possono essere coinvolti nella catena di eventi che portano all'MP. Nei neuroni la concentrazione di Ca libero intracellulare è 4 ordini di grandezza più bassa di quella extracellulare. Questo gradiente transmembrana è essenziale per il mantenimento della integrità cellulare: infatti, un aumento intracellulare di Ca libero o un decremento di quello extracellulare può portare a degenerazione neuronale (91). In condizioni fisiologiche, la bassa concentrazione di Ca libero è garantita dalla

presenza di sistemi tampone (mitocondri, reticolo endoplasmatico, proteine che legano Ca e processi fosforilativi ATP-dipendenti) che lo sequestrano non appena entra nel citoplasma. In condizioni patologiche tali sistemi risultano essere seriamente compromessi (92). Garruto *et al.* evidenziano un incremento nella deposizione di Ca a livello delle neurofibrille in soggetti con parkinsonismi (93). Mentre Mann riscontra una elevata calcificazione nei gangli basali di soggetti con diverse patologie neurodegenerative come MP e Alzheimer (94). Come altri metalli il Ca è coinvolto anche nel danno ossidativo indotto dai ROS. Infatti, lo stress ossidativo causa un aumento di Ca intracellulare, scatenando una serie di eventi a cascata che portano a neurodegenerazione (vedi Figura 1).

Cromo

Il Cr esiste in natura principalmente con due stati di valenza: Cr(III), la forma più stabile e Cr(VI), un forte agente ossidante con elevata tossicità principalmente nei confronti del sistema nervoso e immunitario (95). Il Cr trivalente è un microelemento essenziale, necessario per il metabolismo di colesterolo, grassi e glucosio. Il meccanismo specifico con cui il Cr esavalente produce danno ossidativo non è noto: è probabile intervengano specie intracellulari intermedie, ad esempio Cr(V), formate durante la sua riduzione a Cr(III) per mezzo della glutazione riduttasi (96, 97). È stato dimostrato che il Cr pentavalente è in grado di contribuire alla formazione del radicale NO[•] e di catalizzare reazioni simili a quella di Fenton, contribuendo alla produzione del radicale OH[•] (98). Ne consegue che l'associazione del Cr con l'MP è essenzialmente dovuta alle sue proprietà ossidanti. Alcuni autori riportano variazioni di Cr nel CSF di pazienti con disordini neurologici e/o con tumori al cervello (99), altri, invece, non hanno osservato nei pazienti parkinsoniani alterazioni nei livelli di Cr nel CSF e nel siero rispetto ai controlli (100).

Ferro

Studi sulla distribuzione nel cervello umano hanno dimostrato che il grado di deposito di Fe nei gangli basali (SN, *putamen*, *globus pallidus* e *nucleus caudatus*) aumenta con l'età e in presenza di danni che coinvolgono i gangli stessi (101). C'è evidenza che il metabolismo alterato possa essere correlato a disordini di tipo neurodegenerativo. È stato in genere riscontrato un incremento di Fe nelle regioni cerebrali affette dalla degenerazione; nell'MP, in particolare, sono stati ritrovati incrementi solo nella SN degenerata (102). Nel cervello il Fe è immagazzinato da ferritina e NM. La ferritina mantiene il Fe in una forma inerte attuando un meccanismo protettivo. Un eventuale aumento di Fe nella SN può risultare meno tossico se accompagnato da una adeguata sintesi della ferritina anche se il Fe legato a quest'ultima può essere in parte mobilizzato per la produzione di radicali OH[•] e stimolare la perossidazione lipidica. È stato osservato che i livelli di ferritina sono ridotti nei cervelli parkinsoniani, ma non nel CSF e nel plasma (103). La NM prodotta dai neuroni catecolaminergici della SN e del LC è considerato come il risultato, rispettivamente, della autossidazione della dopamina e noradrenalina. La presenza di tale pigmento nei soggetti MP è direttamente associata alla loro vulnerabilità (104, 105). A differenza della ferritina che è espressa, soprattutto, negli oligodendrociti, negli astrociti e nella microglia, la NM rappresenta la principale fonte di ferro intraneuronale (106, 107) e agisce, quindi, da deposito endogeno di Fe, rivestendo un ruolo rilevante nella difesa dai radicali liberi. In particolare, nella struttura della NM sono stati trovati due siti di affinità per il Fe ferrico, che risulta essere maggiore nei pazienti parkinsoniani rispetto a soggetti sani (108, 109). In altri tessuti del corpo, la melanina protegge dal danno

ossidativo grazie alla sua capacità di legare molecole reattive, come i metalli di transizione (110, 111). Dal momento che la SN è un tessuto che soffre di un'intrinseca ed elevata carica ossidativa si ritiene che la neuromelanina svolga una funzione analoga. In supporto a questa ipotesi è stato visto che la NM *in vitro* riduce il danno ossidativo delle membrane (112). Nonostante ciò, in presenza di alte concentrazioni di Fe, la NM sembra agire da pro-ossidante piuttosto che da anti-ossidante (61). Questo effetto, a prima vista discordante, è da attribuire al legame Fe-melanina, in quanto la variazione dello stato di ossidazione del Fe permette la formazione del radicale idrossilico (113, 114). A dimostrazione di ciò si è visto che incubando *in vivo* NM e Fe il danno ossidativo aumenta invece di decrescere (61). Nei neuroni dopaminergici mielinizzati vulnerabili alle alte concentrazioni di Fe, il danno selettivo è quindi correlato alla presenza di complessi Fe-NM che, in certe condizioni, possono indurre stress ossidativo ed effetti neurotossici. La depigmentazione che si osserva nella SN e nel LC è uno dei più importanti segni patologici della malattia. Dal momento che un aumento significativo di Fe si osserva solo in stadi avanzati, è improbabile che la NM sia di importanza primaria per l'eziopatogenesi dell'MP, ma probabilmente è un meccanismo secondario rilevante che causa neurodegenerazione.

Magnesio

Il Mg è il quarto catione più abbondante nel corpo e il secondo, fra quelli intracellulari, dopo il K (115). Il Mg intracellulare è un cofattore per più di 300 enzimi (chinasi B; $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasi), è necessario per la biosintesi di acidi nucleici e proteine, partecipa alle reazioni che producono e consumano energia (è richiesto come substrato per l'adenilato-ciclastasi e guanilato-ciclastasi) e ha un'azione specifica nel sistema cardiovascolare e neuromuscolare. Come catione bivalente extracellulare aiuta a stabilizzare le membrane eccitabili in cooperazione con il Ca. (116). Il metabolismo del Mg e del Ca sono strettamente correlati, tanto che una dieta povera di Mg causa alterazioni della distribuzione cellulare del Ca (117), aumenta la suscettibilità allo stress ossidativo *in vivo* e la perossidazione lipidica *in vitro* (118). La correlazione fra Mg e i disordini neurodegenerativi è stata evidenziata, ma non del tutto chiarita. Mentre alcuni autori correlano il Mg con la neurodegenerazione solo quando si verificano variazioni nei meccanismi che regolano il metabolismo dell'elemento (119), altri evidenziano meccanismi di degenerazione dell'SNC nei casi di carenza nell'assunzione tramite dieta (120). Tuttavia, anche se gli effetti di una deficienza del Mg sull'SNC non sono del tutto chiari, è probabile che il decremento di concentrazione nei gangli basali possa essere coinvolto nella patogenesi dell'MP (121).

Manganese

La neurotossicità del Mn è ampiamente dimostrata. Gli effetti avversi sull'SNC sono, probabilmente, la conseguenza di una mancata azione protettiva da parte di enzimi deputati alla detossificazione o dell'alterazione del potenziale di ossidazione del Mn. Infatti, la base della sua neurotossicità è dovuta alla capacità della forma bivalente ad ossidarsi nella forma trivalente, una specie fortemente ossidante. D'altra parte il Mn mostra un'elevata affinità per le aree ricche di melanina come il tratto nigrostriatale (122) dove favorisce l'autossidazione della dopamina generando semichinoni e ortochinoni e la produzione di radicali liberi che determinano sostanziali lesioni al sistema dopaminergico (123). Molta attenzione è stata rivolta al possibile coinvolgimento di Mn nell'MP. Sebbene sia noto che un'esposizione occupazionale produca sintomi clinici simili a quelli di pazienti con MP (124, 125) – noti come manganismo – molti autori non hanno riscontrato una correlazione fra livelli di Mn ematico e urinario e sviluppo

della malattia (126). È inoltre importante considerare che il manganismo risulta da una esposizione a dosi molto elevate e che esiste, da un punto di vista anatomico, una discrepanza significativa fra le regioni coinvolte. Infatti, mentre il manganismo determina gravi lesioni degenerative del *globus pallidus*, *nucleus caudatus* e *putamen* lasciando quasi inalterata la SN, nel caso dell'MP è, più o meno, conservato il complesso strio-pallidale ed è tipicamente coinvolta la SNpc (127). Comunque, anche se il manganismo e l'MP sembrano essere due patologie differenti, sono state fatte diverse osservazioni sul possibile ruolo dell'esposizione a questo elemento nella eziologia del Parkinson. Ad esempio, partendo dall'osservazione che la MPTP determina sindromi parkinsoniane e che il suo metabolita MPP⁺ ha una struttura molecolare simile all'erbicide Paraquat, è stata ipotizzata una possibile correlazione fra MP e uso di pesticidi (128). Questo appare particolarmente importante se si considera che molti fungicidi sono a base di Mn (129).

Mercurio

Il Hg è un elemento neurotossico che può portare a danno neuronale attraverso diversi meccanismi: induce la generazione di ROS, inibisce enzimi necessari per la detossificazione come la GPO e SOD (130), provoca rilascio di Ca intracellulare (131) e causa danni al sistema immunitario (132). Un meccanismo secondo cui il Hg ostacola la detossificazione dai radicali liberi prevede la formazione di coniugati con composti tiolici come il glutathione. Elevati livelli di questi coniugati sono stati trovati nella SN di pazienti con MP (133). In studi su animali è stata evidenziata una relazione dose-risposta fra la quantità di Hg assorbita e lo sviluppo dell'MP (134); nell'uomo alti livelli di Hg nel sangue e nelle urine sembrano essere utili parametri biochimici per una possibile diagnosi precoce di MP (135). Le principali fonti di esposizione sono il cibo contaminato (come il pesce) e la presenza di amalgame nei denti (135). Nonostante queste evidenze, altri autori non hanno riscontrato una correlazione diretta tra esposizione e insorgenza della malattia (71). È probabile, però, che le differenze fra i gruppi di popolazione studiate o le differenti vie di esposizione (soprattutto attraverso la dieta e le amalgame) siano alla base della grande variabilità riscontrata (20).

Piombo

Il Pb è il metallo tossico più diffuso, rilevabile in tutti i compartimenti ambientali e in tutti i sistemi biologici. La principale via di esposizione è il cibo, ma, di solito, l'assunzione eccessiva con conseguenze tossiche deriva da fonti ambientali. I problemi specifici variano con l'età (i bambini sono più sensibili) e il rischio maggiore è per l'SNC. Numerosi studi evidenziano che l'esposizione cronica induce una rallentata conduzione nervosa e un alterato metabolismo di Ca (136, 137). Come Cd, Co e Ni, il Pb interferisce con i canali ionici del Ca calmodulina-dipendenti (138, 139) causando effetti citotossici principalmente attraverso perossidazione lipidica delle membrane cellulari (140). Nei neuroni, l'aumento della perossidazione lipidica determina il malfunzionamento delle membrane con possibile morte cellulare (141). L'incremento di tale ossidazione sembra essere localizzato in specifiche aree cerebrali, indicando che il Pb non è distribuito uniformemente all'interno dell'SNC (142). È stato inoltre osservato che interagisce direttamente con il sistema della dopamina, causando una riduzione della regolazione dell'attività dopaminergica (143). Poiché il rilascio del neurotrasmettitore è anche Ca-dipendente, il Pb causa, seppur indirettamente, un'alterazione del trasporto del Ca stesso. Come conseguenza, la conduzione del segnale e la trasmissione neuronale nell'SNC e periferico (SNP) risultano compromesse. La sua associazione con l'MP è stata, molto spesso,

associata all'esposizione occupazionale. Molti autori riportano che il contatto occupazionale simultaneo di più metalli ha potenzialità maggiore dei singoli elementi da soli. A tal riguardo, Gorell dimostra che l'esposizione per più di 20 anni a combinazioni di Pb-Cu e Pb-Fe sono un fattore di rischio non trascurabile (71).

Rame

È normalmente associato a macromolecole come enzimi e proteine, essenziali per il funzionamento neuronale. Si ritrova ad esempio nel sito catalitico della citocromo c ossidasi (cox) e nella Cu-Zn-SOD, enzimi implicati nella protezione dal danno ossidativo. Un deficit di Cu può portare alla inattivazione della cox e della funzione mitocondriale con un conseguente incremento della produzione di ROS (144). L'assunzione di Cu nel cervello umano è mediata soprattutto dalla ceruloplasmina (CP) (145), la cui funzione principale è quella di contrastare il danno ossidativo cellulare (146). Se il Cu non è incorporato nella proteina la CP è rapidamente degradata, come avviene in alcune malattie neurodegenerative. Nonostante ciò, la CP risulta aumentata nel CSF di pazienti MP, mentre i livelli neuronali rimangono inalterati (147). È stata inoltre documentata una interazione anormale fra l' α -sinucleina e un eccesso di Cu nella formazione dei corpi di Lewy, tipici della patologia parkinsoniana (148). Infine, anche le interazioni di Cu con l'omocisteina e con la proteina β -amiloide, sembrano essere responsabili di danni ossidativi a livello cerebrale, con generazione di elevati livelli di H_2O_2 in presenza di elevati livelli di Cu (149). Montgomery dimostra che, sebbene il Cu svolga un ruolo fisiologico anti-ossidante, può sostituire il Fe sia nella reazione di Fenton che nei complessi Fe-NM (70). Inoltre, in presenza di $O_2^{\cdot -}$ o di agenti riducenti come il GSH, il Cu^{2+} può essere ridotto a Cu^+ , catalizzando la formazione del $OH^{\cdot}$ da H_2O_2 nella reazione di Haber-Weiss (150).

Zinco

Il ruolo dello Zn nella malattia di Parkinson non è stato ancora pienamente delucidato. Infatti, a differenza di altri metalli, i meccanismi omeostatici che regolano l'entrata e l'escrezione di Zn dalle cellule sono talmente efficienti che nessun disordine sembra essere associato a un suo eccessivo accumulo (151). Comunque, la neurotossicità dello Zn è stata osservata clinicamente; in determinate condizioni, inoltre, lo Zn ha mostrato tossicità per batteri, virus e neuroni in coltura (152). Anche nell'uomo è stato dimostrato un danno all'SNC con segni di demielinizzazione in soggetti con elevati contenuti sierici di Zn (153). Una possibile spiegazione della demielinizzazione potrebbe essere che le alte concentrazioni di Zn vanno ad inibire l'assorbimento del Fe che riveste un ruolo cruciale nella sintesi e mantenimento della mielina (154). Al contrario, è ormai noto il possibile coinvolgimento dello Zn nel contrastare lo stress ossidativo tramite la sua partecipazione ai meccanismi antiossidanti più importanti del nostro organismo coinvolgenti le Cu-Zn-SOD e il "sistema del glutatione" (155, 156). In presenza di stress ossidativo l'alterazione del rapporto GSH/GSSG può determinare un aumento dei livelli citoplasmatici di Zn attraverso un'interazione fra GSSG e la metallotioneina (MT). È possibile, quindi, che la perdita del GSH sia compensata da un incremento della sintesi della MT in modo da prevenire l'accumulo citoplasmatico di Zn causato dall'interazione MT-GSSG (157). In conclusione Zn e MT insieme sono stati proposti come attivi antiossidanti contro i radicali liberi (158). Inoltre, Persechini *et al.* hanno dimostrato che lo Zn è anche in grado di prevenire la formazione dell' $NO^{\cdot}$ perché in grado di inibire la NOS neuronale attraverso una interazione stechiometrica 1:1 (159).

Altri metalli

Sebbene la tossicità degli altri metalli come Be, Co, Li, Ni, Si e V sia stata ampiamente studiata, la loro associazione con l'MP e, più in generale, con la neurodegenerazione non è ancora chiara. Il Be non sembra essere coinvolto con fenomeni di neurotossicità, tuttavia è conosciuto, insieme ai suoi composti, come elemento cancerogeno. Alcuni studi epidemiologici hanno evidenziato, infatti, un incremento nel rischio di tumore ai polmoni in seguito a esposizione professionale (160, 161). Il Co ha come principale via di esposizione l'inalazione diretta dalla mucosa olfattoria, la quale media la sua entrata nei neuroni olfattori e quindi nel cervello, grazie a trasportatori dei metalli divalenti (162). È ampiamente dimostrato che il Co è in grado di rimpiazzare e sostituire il Ca^{2+} e quindi partecipare agli stessi meccanismi neurotossici (163). Il Li è un elemento ampiamente usato nella terapia farmacologica di diversi disordini neuropsichiatrici. Studi condotti *in vivo* dimostrano il suo ruolo neuroprotettivo attraverso la regolazione dell'attività di molecole che trasducono i segnali intracellulari, come le proteine-chinasi C. Da tali osservazioni è stato anche suggerito come opzione terapeutica di patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer (164). Il Ni è coinvolto nel metabolismo dei lipidi e in particolare con la biosintesi dei fosfolipidi e una sua mancanza causa accumulo di triacilgliceroli nel fegato (165). Si è visto che il Si in combinazione con l'Al forma complessi, gli alluminio-silicati, i quali si accumulano negli intrecci neurofibrillari di pazienti con diversi disordini neurologici (166, 167), mentre l'acido silicico sembra avere un ruolo protettivo legando l'Al e riducendone la biodisponibilità (168). La correlazione del V con fenomeni di neurotossicità è stata documentata con esperimenti *in vivo*. Ad esempio, è documentato che l'anione vanadato è in grado di oltrepassare la membrana emato-encefalica portando a disfunzioni dell'SNC (169). Infine Sasi *et al.* dimostrano che la somministrazione di sali di vanadio ai ratti altera il metabolismo dei lipidi e la concentrazione cellulare di diverse proteine, portando ad un aumento della perossidazione lipidica in varie regioni del cervello (170).

METODOLOGIE DI SPERIMENTAZIONE E MONITORAGGIO

Metodi

Popolazione

Sono stati coinvolti 81 pazienti malati di MP (62 maschi e 19 femmine con età media di $65,5 \pm 9,6$ anni) diagnosticati mediante i criteri della *London Brain Bank Criteria* (171), con durata media della malattia di $5,0 \pm 4,2$ anni, con gravità media della malattia di $1,7 \pm 0,8$ secondo la scala di Hoehn e Yahr (172, 173) e con età media all'esordio di $60,9 \pm 10,3$ anni. Circa il 25% dei pazienti non era stato sottoposto a trattamento con farmaci antiparkinsoniani, mentre il restante 75% era trattato con agonisti dopaminergici, L-dopa o una combinazione dei due farmaci.

Da 43 pazienti (37 maschi e 6 femmine) con un'età media di $64,5 \pm 10,6$ anni, durata e gravità media della malattia rispettivamente di $4,9 \pm 4,0$ anni e $1,6 \pm 0,7$ Hoehn e Yahr e con età media all'esordio di $60,2 \pm 11,3$ anni, sono stati prelevati campioni di CSF. Data l'impossibilità, per ovvie ragioni etiche, di ottenere il liquor di una popolazione sana, i valori sono stati confrontati con un gruppo di controllo di soggetti affetti da patologie del SNP, con disordini muscolari e/o cefalgia (12 individui di cui 7 maschi e 5 femmine, con un'età media di $63,3 \pm 13,8$ anni).

Settantuno pazienti malati di MP (53 maschi e 18 femmine), con un'età media di $65,5 \pm 9,4$ anni, con durata e gravità media della malattia rispettivamente di $4,6 \pm 4,1$ anni e $1,5 \pm 0,8$ Hoehn e Yahr e con età media all'esordio di $61,4 \pm 11$ anni, hanno fornito campioni di siero e sangue. Il gruppo di controllo consisteva in 43 individui sani (32 maschi e 11 femmine) con età media pari a $51,9 \pm 4,0$ anni.

Da tutti gli 81 pazienti sono stati prelevati campioni di capelli. Anche in questo caso, il gruppo di controllo consisteva nei 43 individui non affetti da MP di cui sopra.

Rigidi criteri di esclusione sono stati applicati nella selezione dei soggetti. In particolare, sono stati esclusi gli individui con: disturbi cardiologici e respiratori; anormale funzione renale ed epatica; malassorbimento intestinale; infezioni in atto, assunzione di ormoni tiroidei, litio, sali minerali e vitamine, dieta vegetariana, assunzione di psicofarmaci e di farmaci diversi da quelli contro i parkinsonismi, presenza nell'organismo di parti o protesi metalliche. Tutti i soggetti hanno firmato un consenso informato e sostenuto un colloquio per fornire dettagliate informazioni su personale storia medica, famiglia, stile di vita e abitudini alimentari. Lo studio è stato approvato dalla commissione etica del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Tor Vergata di Roma.

Campionamento, conservazione e trattamento preanalitico

Sono state messe a punto procedure di campionamento, conservazione e trattamento del campione tali da garantire la stabilità del campione e l'integrità dell'informazione analitica. A tale scopo è stato inizialmente effettuato uno studio per la scelta dei materiali più idonei per la raccolta e conservazione dei fluidi in termini di inerzia chimica nei confronti del campione e dei reagenti aggiunti ovvero assenza di fenomeni di adsorbimento e/o rilascio degli elementi di cui si effettua la quantificazione. Il polistirene (provette da 15 mL, Becton Dickinson Labware,

Franklin Lakes, NJ, USA) è risultato il materiale più idoneo per la raccolta e conservazione di CSF, siero e sangue previo contatto per 24 ore con una soluzione al 10% di HNO_3 ultrapuro (Carlo Erba, Milano, Italia) e successivo lavaggio con H_2O deionizzata (EASY-pure, PBI, Milano, Italia). Bustine di plastica sono state utilizzate per la raccolta e conservazione dei capelli.

Il prelievo è stato effettuato dopo astensione per una notte da cibo e da farmaci. I campioni sono stati conservati alla temperatura di $-20\text{ }^\circ\text{C}$ fino all'analisi, per evitare eventuali trasformazioni chimiche, microbiologiche ed enzimatiche del materiale biologico.

Nel programmare il trattamento del campione sono stati considerati metodi che riducessero al minimo la manipolazione al fine di evitare un eventuale apporto esogeno del metallo (sia dall'ambiente di laboratorio sia dai reagenti). Questo trattamento è stato diverso a seconda del fluido biologico considerato.

Nel caso di CSF e siero è stata sufficiente una semplice diluizione con H_2O deionizzata in funzione delle concentrazioni analitiche attese.

Nel caso del sangue il materiale organico presente è stato distrutto eseguendo cicli di digestione con microonde (MW) nelle stesse provette di raccolta, previa aggiunta di acido. In particolare, ogni aliquota di 1 mL di sangue è stata addizionata con 2 mL di HNO_3 ultrapuro (Carlo Erba) e sottoposta a mineralizzazione con MW in un forno ETHOS MEGA II (FKV, Bergamo, Italia) dotato di fibra ottica per il controllo della temperatura (T) e fornito di un rotore MultiPREP 80 (FKV) che permetteva la digestione simultanea di 80 campioni. Il ciclo utilizzato prevedeva:

1. T crescente fino a raggiungere i $70\text{ }^\circ\text{C}$ in 60 minuti;
2. T costante di $70\text{ }^\circ\text{C}$ per 5 ore.

Dopo il raffreddamento, i digeriti sono stati diluiti con H_2O deionizzata.

Per i campioni di capelli è stato usato un trattamento preanalitico più complesso per eliminare contaminazioni esterne causate da fattori ambientali, come polveri e sporcizia, da desquamazione dell'epidermide e dai trattamenti cosmetici. È stata applicata la seguente procedura:

1. lavaggio per 10 minuti sotto continua agitazione magnetica in una soluzione di etere etilico:acetone 3:1 v/v (Riedel-de Haën, Seelze, Germania) per la rimozione dello strato sebaceo che ricopre il capello;
2. lavaggio per 10 ore sotto agitazione in una soluzione al 5% del sale sodico dell'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) (Merck, Darmstadt, Germania) per la rimozione dei metalli eventualmente presenti sulla superficie esterna del capello;
3. ripetuti risciacqui con H_2O deionizzata.

Dopo il lavaggio, i campioni di capelli sono stati asciugati a $85\text{ }^\circ\text{C}$, pesati (ca. 200 mg) e predigeriti per una notte in contenitori di politetrafluoro etilene (PTFE) con una soluzione di $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1 v/v (entrambi di grado ultrapuro; HNO_3 , Carlo Erba; H_2O_2 , Merck, Darmstadt, Germania) ed, infine, mineralizzati con MW mediante il seguente ciclo:

1. 5 minuti a 250 W;
2. 5 minuti a 0 W;
3. 5 minuti a 450 W;
4. 5 minuti a 500 W.

Dopo il raffreddamento, i digeriti sono stati diluiti con H_2O deionizzata.

Analisi degli elementi chimici

La determinazione dei metalli nei fluidi biologici è stata eseguita con tecniche spettroscopiche che permettono la quantificazione di elementi a concentrazioni maggiori (mg mL^{-1}), in traccia ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e ultratraccia (pg mL^{-1}). Gli elementi a concentrazione maggiore, ovvero Ca, Cu, Fe, Mg, Si e Zn sono stati analizzati con la spettrometria di emissione atomica a plasma accoppiato induttivamente (*Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry*, ICP-AES). Gli elementi in traccia e ultratraccia quali Al, Be, Cd, Co, Cr, Hg, Li, Mn, Ni, Pb e V sono stati quantificati con la spettrometria di massa a settore magnetico a plasma accoppiato induttivamente (*Sector Field – Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, SF-ICP-MS). Caratteristiche e condizioni strumentali sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Condizioni operative per l'analisi tramite e SF-ICP-MS

Tecnica	Condizioni operative
ICP-AES	
<i>Strumento</i>	<i>Optima 3100 XL, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA Radiofrequenza 1300 W</i>
Nebulizzatore	a flusso incrociato con camera di raffreddamento di tipo Scott
Flussi dei gas (L min^{-1})	plasma, 13; ausiliario, 0,5; nebulizzatore, 0,7
Risoluzione	massima, 0,006 nm - 200 nm
Policromatore	reticoli a due dimensioni di tipo "echelle"
Rivelatore	a trasferimento di carica (Charge Coupled Device)
SF-ICP-MS	
<i>Strumento</i>	<i>ELEMENT, Thermo Finnigan, Bremen, Germania</i>
Radiofrequenza	1200 W
Nebulizzatore	pneumatico Meinhard con camera di raffreddamento di tipo Scott
Flussi dei gas (L min^{-1})	plasma, 13; ausiliario, 0,5; nebulizzatore, 0,7
Risoluzione ($\text{m}/\Delta\text{m}$)	BR,300; MR,3000
Finestra di massa	BR, 150%; MR, 100%
Finestra di ricerca	BR, 100%; MR, 80%
Finestra di integrazione	BR, 80%; MR, 60%
Numero di scansioni	25 per ciascuna risoluzione

BR: bassa risoluzione; MR: media risoluzione.

La Tabella 2 schematizza le masse utilizzate, i principali interferenti e la risoluzione adottata.

Tabella 2. Isotopi, interferenti e risoluzione selezionata per l'analisi con SF-ICP-MS

Isotopi	Maggiori interferenti	Risoluzione
²⁷ Al	¹¹ B ¹⁶ O, ¹³ C ¹⁴ N, ⁵⁴ Fe ⁺⁺	media risoluzione
⁹ Be	^a	bassa risoluzione
¹¹⁴ Cd	⁹⁸ Mo ¹⁶ O, ¹¹⁴ Sn	bassa risoluzione e correzione matematica
⁵⁹ Co	⁴⁰ Ar ¹⁹ F, ⁴³ Ca ¹⁶ O, ⁴¹ K ¹⁸ O, ⁴² Ca ¹⁶ O ¹ H	media risoluzione
⁵² Cr	⁴⁰ Ar ¹² C, ³⁶ Ar ¹⁶ O, ³⁸ Ar ¹⁴ N, ³⁵ Cl ¹⁷ O, ³⁷ Cl ¹⁵ N, ³⁵ Cl ¹⁶ O ¹ H	media risoluzione
²⁰² Hg	^a	bassa risoluzione
⁷ Li	^a	bassa risoluzione
⁵⁵ Mn	³⁷ Cl ¹⁸ O, ⁴⁰ Ar ¹⁵ N, ³⁹ K ¹⁶ O, ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ¹ H	media risoluzione
⁶⁰ Ni	⁴⁴ Ca ¹⁶ O, ²³ Na ³⁷ Cl, ³⁶ Ar ²⁴ Mg, ¹²⁰ Sn ⁺⁺	media risoluzione
²⁰⁸ Pb	^a	bassa risoluzione
⁵¹ V	³⁵ Cl ¹⁶ O, ³⁷ Cl ¹⁴ N, ⁴⁰ Ar ¹¹ B, ³⁶ Ar ¹⁴ N ¹ H	media risoluzione

^a nelle matrici considerate non ci sono interferenti significativi

Tutte le interferenze spettrali nell'intervallo di massa 27-60 sono state risolte attraverso l'uso della media risoluzione. Per ogni elemento sono stati selezionati gli isotopi più abbondanti ad eccezione del Ni, per il quale la sovrapposizione isobarica di ^{58}Fe non ha permesso l'uso di ^{58}Ni . Inoltre, è stato necessario ricorrere alla correzione matematica per la quantificazione di Cd alla massa 114, interferita dalla specie isobarica ^{114}Sn e dall'ossido $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}$.

Il metodo è stato valutato mediante il calcolo dei limiti di rivelabilità (*Limit of Detection*, LoD), dei limiti di quantificazione (*Limit of Quantification*, LoQ), dell'accuratezza e della precisione. Il LoD strumentale di ogni elemento è stato calcolato in base a 3 volte la deviazione standard (σ) della fluttuazione del bianco (soluzione acida al 5% HNO_3). I LoQ, invece, sono stati calcolati nella stessa maniera, moltiplicando però il σ per un fattore 10. Per entrambe le tecniche l'accuratezza è stata verificata usando materiale di riferimento certificato (*Certified Reference Material*, CRM) a base di siero, sangue (Clincheck, Recipe, Monaco, Germania) e capelli (BCR CRM 397, IRMM, Geel, Belgio). Non esistendo CRM per il CSF, l'accuratezza è stata valutata aggiungendo appropriate quantità di analiti sulla matrice e calcolandone il recupero. La precisione, invece, è stata determinata replicando 20 analisi di campioni reali.

Determinazione dello stato ossidativo

Per la quantificazione dello stress ossidativo sono state impiegate metodiche colorimetriche che hanno consentito l'analisi di un elevato numero di campioni in tempi brevi: il d-ROMs test per una valutazione globale delle specie ossidanti presenti nel siero (*Serum Oxidative Status*, SOS) e l'Oxy-Adsorbent test per la misura della barriera antiossidante (*Serum Antioxidant Capacity*, SAC) (Diacron, Grosseto, Italia).

Il d-ROMs valuta nel siero il livello di idroperossidi, una classe di metaboliti che si formano per l'azione di deidrogenazione e successiva perossidazione da parte del radicale $\text{OH}^\cdot$ su una vasta gamma di composti fra cui proteine, lipidi, aminoacidi ecc. Tale metodica sfrutta la capacità degli idroperossidi nel generare radicali liberi dopo reazioni con alcuni metalli di transizione, come per esempio $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, in accordo con la reazione di Fenton. Questi derivati, reagendo con un particolare cromogeno opportunamente tamponato, sviluppano un complesso colorato misurabile fotometricamente. La concentrazione è espressa in unità arbitrarie dette U.CARR equivalenti a 0.08 mg di radicali per 100 mL di H_2O_2 . Valori compresi fra 250-300 U.CARR indicano stato ossidativo normale, mentre valori superiori indicano stress ossidativo.

A livello ematico, la difesa nei confronti dell'attacco lesivo delle specie reattive, e in particolar modo, dei radicali liberi, può essere sostenuta da una serie di sostanze di natura esogena (es. ascorbato, tocoferoli, carotenoidi, bioflavonoidi, ecc.) ed endogena (es. proteine, bilirubina, acido urico, colesterolo, GSH, ecc.). L'Oxy-Adsorbent valuta la capacità del siero di opporsi all'azione ossidativa di una soluzione di acido ipocloroso (HClO). L' HClO si forma in situazioni fisiologiche da H_2O_2 e ioni cloro ed è un potente ossidante naturale. Il campione da analizzare viene sottoposto all'azione ossidante massiva di una soluzione di HClO a titolo noto, in evidente eccesso rispetto alla capacità di essere "adsorbito" da parte della barriera antiossidante in esame. L' HClO residuo viene fatto reagire con un'ammina aromatica sostituita (Ar-NH_2) la quale ossidandosi a spese dell'acido si trasforma in un derivato colorato ($[\text{Ar-NH}_2]^\cdot$). La concentrazione del complesso colorato è direttamente proporzionale alla concentrazione di HClO rimasta in eccesso e inversamente proporzionale alla capacità antiossidante del siero stesso. Il risultato è espresso in μmol di HClO "adsorbiti" da 1 mL di siero. Valori sopra i $350 \mu\text{mol mL}^{-1}$ di HClO sono considerati normali, valori più bassi indicano decremento della capacità antiossidante.

Valutazione statistica

I parametri della popolazione sono stati descritti in termini di media, deviazione standard (DS), 25°-75° percentile. I test statistici utilizzati sono stati:

1. test U di Mann-Whiney;
2. test di correlazione di Spearman;
3. analisi discriminante;
4. analisi ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

Il test U di Mann-Whitney e il test di correlazione di Spearman offrono il vantaggio di individuare un livello di probabilità esatto con qualunque tipo di distribuzione della popolazione da cui il campione è estratto. Il primo consente di confrontare una singola variabile per i soggetti appartenenti a due gruppi diversi. Il secondo dà informazioni sulle relazioni che intercorrono tra le variabili. Per entrambi i test il valore di significatività accettato è stato $p \leq 0,05$.

Allo scopo di esaminare contemporaneamente tutte le variabili in esame e quindi trarre la massima informazione eliminando le variabili statisticamente meno importanti è stato seguito un approccio di tipo multivariato, applicando l'analisi discriminante. Questo metodo di classificazione permette di individuare le variabili indipendenti che maggiormente determinano l'appartenenza o meno di un'osservazione ad uno di due o più gruppi già noti *a priori*. La bontà della classificazione è stata validata mediante una validazione interna (*cross-validation*) del tipo *leave-one-out*. L'individuazione delle variabili maggiormente discriminanti e quindi più significative nella classificazione avviene con procedura di tipo *forward* cioè di volta in volta le variabili vengono inserite in base a un F statistico per verificare il loro contributo al modello finale. I parametri importanti per valutare il modello ottenuto sono: il Lambda di Wilks (tra 0 e 1, massimo e minimo potere discriminante) e i coefficienti standardizzati delle variabili selezionate (indicano la loro importanza relativa, più alto è il loro valore assoluto maggiore è il loro contributo unico al potere discriminante). Sebbene l'analisi discriminante presupponga la normalità dei dati di partenza è anche vero che violazioni all'assunzione di normalità non sono state considerate "fatali" per l'efficienza del test in quanto la mancata normalità non era dovuta alla presenza di *outlier*.

Poiché le concentrazioni rilevate sono variabili continue, è utile l'individuazione di valori soglia (*cut off*) che consentano di orientare l'interpretazione tra malattia e stato di salute. Un valore di *cut off* ottimale non esiste ma dipende dal valore coincidente con una variazione di sensibilità (probabilità di ottenere un risultato vero-positivo nella classe dei malati) e di specificità (probabilità di ottenere un vero-negativo nella classe dei sani) del test. L'analisi ROC applicata ha permesso di legare la sensibilità alla probabilità di ottenere un falso-positivo nella classe dei sani. Esaminando l'area della curva ottenuta (*Area Under Curve*, AUC) i cui valori variano tra 1,0 e 0,5, secondo la scala di classificazione proposta da Swets, si misura la capacità discriminante del test.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il programma statistico SPSS-12.0.1 versione per Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Risultati

Prestazioni dei metodi analitici

Le prestazioni dei metodi sviluppati sono state valutate mediante il calcolo dei limiti LoD e LoQ, dell'accuratezza e della precisione. La Tabella 3 riporta i valori dei limiti in ng mL⁻¹ ottenuti in soluzione al 5% di HNO₃. Entrambe le tecniche mostrano limiti più che adeguati ai fini delle determinazioni previste. Nel caso dell'ICP-AES si passa da valori di 2,0 ng mL⁻¹ per Ca e Si a valori di 3,0 per Mg e a 5,0 ng mL⁻¹ per Cu, Fe e Zn. Per la quantificazione degli elementi presenti in traccia effettuata mediante la tecnica SF-ICP-MS, il raggiungimento di bassi LoD riveste un significato ovviamente più rilevante. In questo caso i valori sono al di sotto di 0,006 ng mL⁻¹ per tutti gli elementi eccetto l'Al per il quale si ha un LoD pari a 0,05 ng mL⁻¹.

Tabella 3. Limiti di rivelabilità (LoD) e di quantificazione (LoQ) delle tecniche analitiche utilizzate (ng mL⁻¹)

Elementi	LoD	LoQ
Al ^a	0,05	0,165
Be ^a	0,004	0,013
Ca ^b	2,0	6,6
Cd ^a	0,001	0,003
Co ^a	0,002	0,006
Cr ^a	0,002	0,006
Cu ^b	5,0	16,6
Fe ^b	5,0	16,6
Hg ^a	0,005	0,016
Li ^a	0,007	0,021
Mg ^b	3,0	10
Mn ^a	0,004	0,013
Ni ^a	0,002	0,006
Pb ^a	0,006	0,019
Si ^b	2,0	6,6
V ^a	0,002	0,006
Zn ^b	5,0	16,6

^a: SF-ICP-MS; ^b: ICP-AES.

I risultati relativi alla accuratezza sui CRM e alle prove di recupero sono riportati in Tabella 4. Nel caso dell'ICP-AES gli intervalli di accuratezza ottenuti variano da 94,6% per Zn a 107% per Mg nel CSF, da 98% per Mg e Zn a 108% per Si nel siero, da 97,8% per Zn a 106% per Mg nel sangue e da 96% per Ca e Mg a 99,5% per Zn nei capelli. Per il SF-ICP-MS i valori sono compresi tra 90% per Mn e 110% per Hg in CSF, tra 92,5% per Cr e 107% per Ni nel siero, tra 92% per Al e 110% per Cd nel sangue e tra 94% per Al e Mn e 108% per Hg nei capelli. La precisione dei metodi sviluppati ha evidenziato buoni risultati per entrambe le tecniche. Per l'ICP-AES la precisione peggiore era pari al 4,3% (Zn) nel CSF, 5,3% (Si) nel siero, 2,9% (Cu) nel sangue e 3,0% (Mg) nei capelli. Per il SF-ICP-MS sono state ottenute precisioni massime pari a 5,2% (V) per il CSF, 3,8% (Mn) per il siero, 4,3% (Cd) per il sangue e 4,9% (Pb) per i capelli.

Tabella 4. Accuratezza dell'analisi dei metalli nelle differenti matrici. Concentrazioni e DS in ng mL⁻¹

Elemento	Matrice									
	CSF		Siero		Sangue		Capelli			
	trovato	atteso	trovato	atteso	trovato	atteso	trovato	atteso		
Al	2,46 ± 0,12	2,5 ^a	19,8 ± 0,4	20 ± 5	9,20 ± 0,31	10 ^a	1410 ± 76	1500 ^a		
Be	0,19 ± 0,01	0,2 ^a	0,47 ± 0,02	0,5 ^a	0,48 ± 0,03	0,5 ^a	na	na		
Ca	14300 ± 849	15000 ^a	52400 ± 2610	50000 ^a	51800 ± 3420	50000 ^a	1500 ± 139 ^d	1560 ± 40 ^{b, d}		
Cd	0,098 ± 0,008	0,1 ^a	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,06	1,32 ± 0,09	1,2 ± 0,4	553 ± 15	521 ± 24		
Co	0,094 ± 0,009	0,1 ^a	0,96 ± 0,05	1,0 ± 0,3	1,68 ± 0,11	1,6 ± 0,5	580 ± 52	550 ± 30 ^b		
Cr	0,48 ± 0,02	0,5 ^a	1,11 ± 0,08	1,2 ± 0,3	1,98 ± 0,15	2,0 ± 0,5	89000 ± 6100	91000 ± 33000 ^b		
Cu	15,8 ± 1,1	15 ^a	852 ± 76	865 ± 216	985 ± 75	1000 ^a	108000 ± 1000	110000 ± 5000 ^c		
Fe	14,3 ± 1,0	15 ^a	651 ± 50	642 ± 161	257 ± 19 ^d	250 ^{a, d}	576 ± 41 ^d	580 ± 10 ^{b, d}		
Hg	0,55 ± 0,02	0,5 ^a	0,25 ± 0,03	0,27 ± 0,07	2,92 ± 0,11	2,9 ± 1,0	13335 ± 123	12300 ± 500		
Li	0,48 ± 0,03	0,5 ^a	1,15 ± 0,07	1,0 ^a	1,10 ± 0,08	1,0 ^a	na	na		
Mg	16100 ± 1250	15000 ^a	19600 ± 1350	20000 ± 5000	26500 ± 1840	25000 ^a	192 ± 17 ^d	200 ± 5 ^{b, d}		
Mn	0,45 ± 0,08	0,5 ^a	1,46 ± 0,11	1,4 ± 0,3	23,7 ± 1,5	23,8 ± 4,7	10548 ± 989	11200 ± 300 ^b		
Ni	2,60 ± 0,15	2,5 ^a	1,50 ± 0,10	1,4 ± 0,3	8,1 ± 0,6	7,5 ± 1,8	na	na		
Pb	0,49 ± 0,02	0,5 ^a	0,46 ± 0,04	0,5 ^a	107 ± 5	105 ± 24	34564 ± 2830	33000 ± 1200		
Si	28,9 ± 1,4	30 ^a	162 ± 12	150 ^a	158 ± 13	150 ^a	9870 ± 425	10000 ^a		
V	0,096 ± 0,002	0,1 ^a	0,047 ± 0,002	0,05 ^a	0,053 ± 0,003	0,05	na	na		
Zn	14,2 ± 1,0	15 ^a	839 ± 44	856 ± 214	4890 ± 248	5000 ^a	198 ± 16 ^d	199 ± 5 ^d		

^a: quantità aggiunte su campioni reali; ^b: valori informativi; ^c: valori indicativi; ^d: espresso in µg mL⁻¹; na: non analizzato.

Variazione degli elementi chimici con la malattia

Fluido cerebrospinale

La Tabella 5 riporta la concentrazione degli elementi nel CSF di pazienti MP e controlli in termini di media $\pm$ DS e 25°-75° percentile, nonché la significatività delle differenze riscontrate fra le due popolazioni.

Tabella 5. Concentrazione (ng mL⁻¹) degli elementi nel CSF di pazienti MP e controlli

	Pazienti MP (n. 43)		Controlli (n. 12)	
	Media $\pm$ DS	25°-75°	Media $\pm$ DS	25°-75°
Al	2,15 $\pm$ 1,03	1,44 – 2,79	2,64 $\pm$ 0,51	2,40 – 2,88
Be	0,56 $\pm$ 0,21	0,42 – 0,67	0,70 $\pm$ 0,37	0,41 – 0,94
Ca	27313 $\pm$ 3386	25935 – 29206	26956 $\pm$ 5515	23564 – 30838
Cd	0,04 $\pm$ 0,02	0,02 – 0,05	0,05 $\pm$ 0,03	0,04 – 0,07
Co ^a	0,09 $\pm$ 0,09	0,02 – 0,13	0,13 $\pm$ 0,05	0,10 – 0,17
Cr ^b	0,65 $\pm$ 0,46	0,29 – 0,89	1,28 $\pm$ 0,59	0,75 – 1,63
Cu	19,4 $\pm$ 7,9	13,9 – 23,5	21,9 $\pm$ 4,8	17,9 – 26,2
Fe ^a	28,2 $\pm$ 14,6	17,6 – 37,4	35,5 $\pm$ 5,0	35,3 – 39,1
Hg	0,73 $\pm$ 0,32	0,45 – 0,97	1,05 $\pm$ 0,46	0,78 – 1,49
Li	0,82 $\pm$ 0,53	0,39 – 1,02	0,49 $\pm$ 0,10	0,47 – 0,54
Mg	23693 $\pm$ 4263	20728 – 27051	21868 $\pm$ 3509	19045 – 23925
Mn	0,69 $\pm$ 0,42	0,38 – 1,12	0,95 $\pm$ 0,39	0,68 – 1,18
Ni ^a	3,34 $\pm$ 3,61	0,46 – 5,68	5,40 $\pm$ 3,33	2,44 – 7,54
Pb ^b	0,46 $\pm$ 0,24	0,28 – 0,63	0,91 $\pm$ 0,36	0,60 – 1,19
Si ^a	58,4 $\pm$ 44,8	19,9 – 87,2	95,0 $\pm$ 38,3	61,6 – 108
V	0,07 $\pm$ 0,03	0,05 – 0,09	0,09 $\pm$ 0,03	0,06 – 0,11
Zn	27,7 $\pm$ 9,01	21,8 – 31,0	32,3 $\pm$ 11,4	22,3 – 39,4

^a: $p < 0,05$; ^b: $p < 0,001$.

Nel CSF dei pazienti la più bassa concentrazione media (0,1 ng mL⁻¹) è stata riscontrata per Cd, Co e V, concentrazioni comprese tra 0,1 e 1 ng mL⁻¹ per Be, Cr, Hg, Li, Mn e Pb - con il valore più basso per Pb (0,46 $\pm$ 0,24 ng mL⁻¹) e il valore più alto per Li (0,82 $\pm$ 0,53 ng mL⁻¹) - e comprese tra 1 e 5 ng mL⁻¹ per Al e Ni. Tutti gli elementi maggiori hanno presentato livelli da 19,4 $\pm$ 7,9 ng mL⁻¹ per Cu a 27313 $\pm$ 3386 ng mL⁻¹ per Ca. Confrontando le due popolazioni Co, Cr, Fe, Ni, Pb e Si risultano significativamente diversi, con valori più bassi nei pazienti MP. La Figura 4 mostra le deviazioni percentuali del contenuto degli elementi nel CSF della popolazione patologica rispetto alla popolazione sana presa come riferimento (controlli = 0). È evidente che nello stato patologico si verifica una riduzione dei 6 elementi superiore o uguale al 50%.

La Tabella 6 riporta la distribuzione degli elementi nelle due popolazioni in funzione del sesso e le significatività delle differenze riscontrate.

Nei pazienti di entrambi i sessi è evidenziata una significativa minor concentrazione di Pb ($p = 0,02$) rispetto al gruppo di controllo, mentre nelle femmine MP si ha una diminuzione di un congruo numero di elementi quali Be, Cd, Cr, Fe, Ni e Si (tutti con $p < 0,03$). Tuttavia il basso numero di femmine MP potrebbe rendere poco attendibili le significatività ottenute. Le correlazioni significate evidenziate tra livelli di analiti e parametri relativi alla malattia (test di Spearman) sono presentate in Tabella 7.

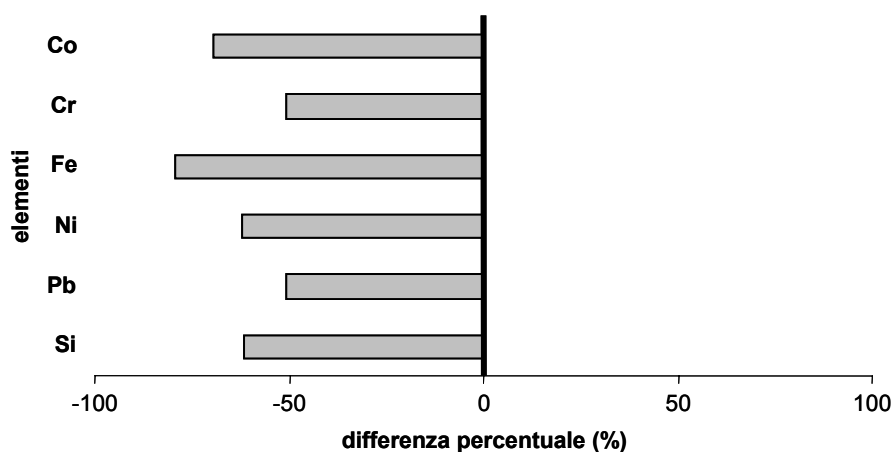


Figura 4. Deviazioni percentuali degli elementi nel CSF dei malati rispetto ai controlli (0)

Tabella 6. Concentrazione (ng mL^{-1}) degli elementi nel CSF di maschi (M) e femmine (F) nei pazienti e nei controlli

	Pazienti MP		Controlli	
	M (n. 37)	F (n. 6)	M (n. 8)	F (n. 5)
Al	2,10 $\pm$ 1,07	2,42 $\pm$ 0,81	2,35 $\pm$ 0,48	2,93 $\pm$ 0,39
Be ^a	0,56 $\pm$ 0,22	0,56 $\pm$ 0,12	0,42 $\pm$ 0,10	1,05 $\pm$ 0,24
Ca	27315 $\pm$ 3538	27300 $\pm$ 2574	29017 $\pm$ 5382	24069 $\pm$ 4723
Cd ^a	0,04 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,01
Co	0,09 $\pm$ 0,09	0,11 $\pm$ 0,08	0,11 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,05
Cr ^a	0,64 $\pm$ 0,47	0,66 $\pm$ 0,39	0,92 $\pm$ 0,49	1,56 $\pm$ 0,55
Cu	19,8 $\pm$ 8,28	17,2 $\pm$ 6,27	22,5 $\pm$ 4,11	21,1 $\pm$ 5,96
Fe ^a	28,0 $\pm$ 14,7	28,9 $\pm$ 15,4	34,6 $\pm$ 6,12	36,7 $\pm$ 3,78
Hg	0,71 $\pm$ 0,32	0,84 $\pm$ 0,33	0,77 $\pm$ 0,12	1,26 $\pm$ 0,53
Li	0,87 $\pm$ 0,53	0,56 $\pm$ 0,49	0,53 $\pm$ 0,08	0,43 $\pm$ 0,11
Mg	23598 $\pm$ 4313	24195 $\pm$ 4334	22447 $\pm$ 4154	21056 $\pm$ 2561
Mn	0,71 $\pm$ 0,43	0,56 $\pm$ 0,34	0,99 $\pm$ 0,47	0,92 $\pm$ 0,37
Ni ^a	3,51 $\pm$ 3,73	2,14 $\pm$ 2,61	2,14 $\pm$ 1,20	8,01 $\pm$ 1,39
Pb ^{a b}	0,46 $\pm$ 0,23	0,45 $\pm$ 0,30	0,82 $\pm$ 0,34	1,01 $\pm$ 0,40
Si ^a	63,9 $\pm$ 46,5	28,9 $\pm$ 13,6	96,8 $\pm$ 37,1	92,5 $\pm$ 44,3
V	0,07 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,01
Zn	27,9 $\pm$ 9,21	26,4 $\pm$ 8,63	33,4 $\pm$ 12,0	30,8 $\pm$ 11,6

a: differenze significative tra F malate e sane; b: differenze significative tra M malati e sani.

Tabella 7. Correlazioni fra livelli di analiti nel CSF e parametri clinici

Elemento	Esordio	Gravità	Durata	Terapia
Al			$p = 0,05$; $\rho = -0,33$	
Cd	$p = 0,03$; $\rho = -0,34$			
Co		$p = 0,05$; $\rho = -0,32$		
Cr		$p = 0,01$; $\rho = -0,42$	$p = 0,03$; $\rho = -0,37$	$p = 0,04$; $\rho = -0,34$
Mg		$p < 0,01$; $\rho = -0,52$	$p < 0,01$; $\rho = -0,59$	
Ni		$p = 0,04$; $\rho = -0,34$		
Pb		$p = 0,01$; $\rho = -0,43$		
Zn		$p = 0,04$; $\rho = 0,35$		

Gli analiti riportati in tabella correlano, ad eccezione dello Zn, inversamente con i parametri clinici studiati; la maggior parte di questi metalli sembra essere influenzata dalla gravità della malattia. Il Cr risulta l'elemento più suscettibile alle variabili cliniche considerate e l'unico influenzato dall'assunzione di farmaci.

L'analisi discriminante ha individuato il Pb come elemento in grado di classificare i soggetti, sebbene il valore di Lambda di Wilks troppo alto renda questo risultato poco significativo. Probabilmente ciò è dovuto alla diversa dimensione dei due gruppi in esame. Anche l'analisi ROC, i cui risultati sono mostrati in Tabella 8, ha messo in evidenza il Pb come unico elemento con un valore di AUC prossimo a 1 e quindi unico marcatore moderatamente accurato (in base alla scala di Swets) della malattia. Inoltre, in base al valore soglia scelto lo stato patologico sembra essere caratterizzato da concentrazioni inferiori $0,60 \text{ ng mL}^{-1}$ con specificità e sensibilità superiori al 70%.

Tabella 8. Parametri della curva ROC per il CSF

Elemento	AUC	Errore standard	Intervallo di confidenza	Sensibilità	1-Specificità	Valore-soglia (ng mL^{-1})
Pb	0,86	0,054	0,76-0,97	0,72	0,30	0,60

Siero

La concentrazione degli elementi nel siero delle due popolazioni è riportata in Tabella 9 in termini di media $\pm$ DS e 25°-75° percentile. Sono mostrate anche le differenze significative ottenute. Nei malati si osserva una concentrazione media compresa tra $0,05$ e 1 ng mL^{-1} per Be, Cd, Co, Cr, Li, Mn, Ni, Pb e V - con il valore più basso per il Cd ($0,07 \pm 0,03 \text{ ng mL}^{-1}$) e quello più alto per il Mn ($0,66 \pm 0,24 \text{ ng mL}^{-1}$) - e una concentrazione compresa fra 1 e 5 ng mL^{-1} per Al e Hg. Per gli elementi maggiori sono stati osservati livelli da $295 \pm 104 \text{ ng mL}^{-1}$ per il Si a $67259 \pm 9938 \text{ ng mL}^{-1}$ per il Ca.

Tabella 9. Concentrazione degli elementi (ng mL^{-1}) nel siero di pazienti MP e controlli

	Pazienti MP (n. 71)		Controlli (n. 43)	
	Media $\pm$ DS	25°-75°	Media $\pm$ DS	25°-75°
Al	$3,05 \pm 1,64$	1,81 – 4,04	$2,79 \pm 1,51$	1,65 – 3,91
Be	$0,30 \pm 0,17$	0,19 – 0,47	$0,24 \pm 0,14$	0,10 – 0,35
Ca ^a	67259 ± 9938	61344 – 74486	61378 ± 5635	58030 – 65648
Cd ^a	$0,07 \pm 0,03$	0,05 – 0,09	$0,10 \pm 0,05$	0,07 – 0,12
Co ^a	$0,11 \pm 0,05$	0,08 – 0,12	$0,19 \pm 0,10$	0,11 – 0,25
Cr	$0,35 \pm 0,07$	0,12 – 0,32	$0,18 \pm 0,07$	0,13 – 0,22
Cu	987 ± 238	798 – 1116	910 ± 197	755 – 1062
Fe ^a	1122 ± 432	834 – 1479	1596 ± 442	1299 – 1892
Hg	$2,02 \pm 1,67$	0,65 – 2,91	$1,41 \pm 0,73$	0,95 – 1,72
Li ^b	$0,79 \pm 0,60$	0,35 – 1,01	$1,01 \pm 0,75$	0,60 – 1,55
Mg ^b	19012 ± 3215	16850 – 21199	17200 ± 1781	16466 – 18550
Mn	$0,66 \pm 0,24$	0,52 – 0,84	$0,65 \pm 0,24$	0,48 – 0,80
Ni ^a	$0,64 \pm 0,33$	0,41 – 0,77	$0,43 \pm 0,36$	0,17 – 0,56
Pb	$0,62 \pm 0,34$	0,36 – 0,81	$0,52 \pm 0,22$	0,36 – 0,61
Si ^a	295 ± 104	217 – 368	$111 \pm 55,3$	74,1 – 136
V ^a	$0,11 \pm 0,07$	0,06 – 0,15	$0,06 \pm 0,03$	0,04 – 0,07
Zn ^a	717 ± 125	633 – 798	813 ± 135	704 – 910

^a: $p < 0,001$; ^b: $p < 0,05$.

Gli elementi significativamente diversi fra le due popolazioni sono risultati Ca, Cd, Co, Fe, Li, Mg, Ni, Si, V e Zn. In particolare Cd, Co, Fe, Li e Zn presentano concentrazioni più basse nei malati rispetto ai sani, mentre Ca, Mg, Ni, Si e V livelli più alti. In termini di deviazioni percentuali rispetto alla popolazione sana sono state evidenziati nei pazienti valori di Ni, Si e V più alti di ca. 150- 250% (Figura 5).

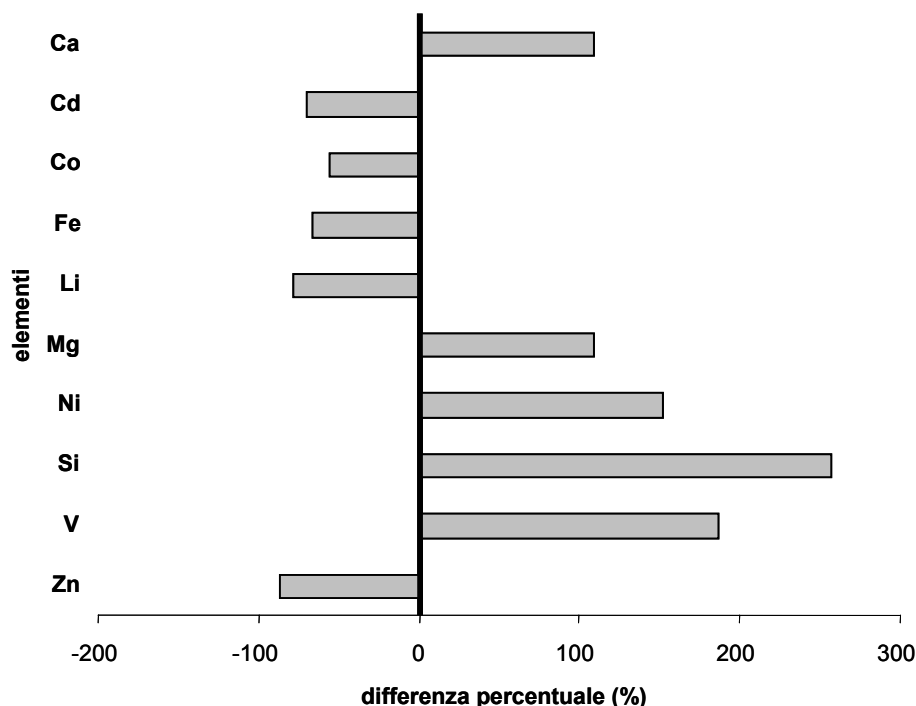


Figura 5. Deviazioni percentuali degli elementi nel siero dei malati rispetto ai controlli (0)

La Tabella 10 mostra i livelli di tutti gli analiti e le differenze significative ottenute in funzione del sesso. L'analisi dei dati conferma nei maschi MP, rispetto a quelli del gruppo di controllo, le differenze statisticamente significative ottenute precedentemente (tutte con $p < 0,01$) ad eccezione del Li. Nelle femmine MP, invece, Mg, Ni, V e Zn non sono risultati essere statisticamente diversi rispetto alle femmine sane. All'interno dei due gruppi di popolazione, risultano significative le maggiori concentrazioni di Hg nei maschi MP ($p < 0,01$) rispetto alle femmine MP e i minori livelli di Ca, Cu e Ni nei maschi del gruppo di controllo ($p < 0,05$) con le rispettive femmine.

Lo studio delle correlazioni ha indicato soltanto una lieve correlazione positiva del Ni con la durata della malattia ($p = 0,02$; $\rho = 0,31$). L'analisi discriminante ha individuato Co, Ni e Si come elementi in grado, nel loro insieme, di classificare i soggetti sani e malati, con un buon potere discriminante (Lambda di Wilks = 0,335). La Tabella 11 riporta i coefficienti standardizzati relativi ai tre metalli selezionati e mostra come SI abbia un peso decisamente maggiore degli altri due elementi nella funzione discriminante.

Come mostrato nella Tabella 12, la classificazione ha dato come risultato il 93,0% di casi raggruppati originali correttamente classificati (90,7% per i pazienti MP e 94,4% per i controlli) e il 91,2% di casi raggruppati cross-validati correttamente classificati (90,7% per i pazienti MP e 91,5% per i controlli).

I risultati ottenuti dall'analisi ROC sono riportati in Tabella 13.

Tabella 10. Concentrazione (ng mL⁻¹) degli elementi nel siero dei maschi (M) e femmine (F) nei pazienti e nei controlli

	Pazienti MP		Controlli	
	M (n. 53)	F (n. 18)	M (n. 32)	F (n. 11)
Al	3,19 ± 1,69	2,65 ± 1,48	2,80 ± 1,43	2,76 ± 1,81
Be	0,29 ± 0,16	0,35 ± 0,19	0,24 ± 0,14	0,24 ± 0,14
Ca ^{a, b, d}	66313 ± 9566	69886 ± 10747	60434 ± 5603	64125 ± 4990
Cd ^{a, b}	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,11 ± 0,06
Co ^{a, b}	0,11 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,20 ± 0,09	0,17 ± 0,11
Cr	0,38 ± 0,44	0,27 ± 0,28	0,19 ± 0,07	0,14 ± 0,04
Cu ^d	956 ± 226	1084 ± 255	866 ± 192	1039 ± 153
Fe ^{a, b}	1168 ± 414	992 ± 467	1583 ± 372	1636 ± 641
Hg ^c	2,31 ± 1,74	1,21 ± 1,17	1,39 ± 0,73	1,47 ± 0,77
Li ^b	0,81 ± 0,63	0,73 ± 0,51	0,97 ± 0,70	1,13 ± 0,56
Mg ^a	18872 ± 3223	19416 ± 3248	17112 ± 1885	17456 ± 1490
Mn	0,66 ± 0,23	0,68 ± 0,27	0,66 ± 0,34	0,64 ± 0,37
Ni ^{a, d}	0,66 ± 0,34	0,57 ± 0,31	0,38 ± 0,32	0,58 ± 0,46
Pb	0,63 ± 0,34	0,57 ± 0,36	0,56 ± 0,22	0,38 ± 0,15
Si ^{a, b}	303 ± 102	272 ± 108	102 ± 44	136 ± 78
V ^a	0,11 ± 0,07	0,12 ± 0,08	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,04
Zn ^a	718 ± 129	712 ± 116	828 ± 132	767 ± 140

^a: differenze significative fra M malati e sani; ^b: differenze significative fra F malate e sane; ^c: pazienti MP, F vs M; ^d: controlli, F vs M.

Tabella 11. Coefficienti standardizzati della funzione discriminante per il siero

Elemento	Coefficiente standardizzato
Si	0,884
Co	0,534
Ni	0,457

Tabella 12. Classificazione nel siero in base alla funzione discriminante

Tipo di classificazione		Stato	Attribuzione		Totali
			Pazienti (MP)	Controlli (CR)	
Originale	Conteggio (n)	MP	67	4	71
	"	CR	4	39	43
	Percentuale (%)	MP	94,4	5,6	100,0
	"	CR	9,3	90,7	100,0
Cross-validato	Conteggio (n)	MP	65	6	71
	"	CR	4	39	43
	Percentuale (%)	MP	91,5	8,5	100,0
	"	CR	9,3	90,7	100,0

Tabella 13. Parametri dell'analisi ROC per il siero

Elemento	AUC	ES	Intervallo di confidenza	Sensibilità	1-Specificità	Valore-soglia (ng mL ⁻¹)
Si	0,94	0,02	0,90-0,98	0,84	0,05	183
Ni	0,74	0,06	0,62-0,85	0,86	0,35	0,36
Co	0,71	0,05	0,68-0,88	0,80	0,28	0,13

ES: errore standard.

I risultati confermano la buona capacità di Si (AUC prossima a 1) quale marcatore altamente accurato della patologia con livelli più alti rispetto al valore soglia nei soggetti malati. Tra l'altro il valore soglia fornisce un'elevata specificità (95%) senza perdita di sensibilità. Al contrario la minor estensione dell'AUC relativa a Ni e Co mostra come il *cut-off* di questi due elementi sia meno significativo per separare propriamente le popolazioni sotto studio. Ciò detto, livelli minori di Co e maggiori di Ni nel siero dei malati rispetto ai valori soglia potrebbero individuare lo stato patologico.

In Figura 6 è raffigurata, per il Si, la relazione fra i parametri ricavati dall'analisi ROC riportando, per ogni possibile valore soglia, la proporzione di veri positivi in ordinata (sensibilità) e la proporzione di falsi positivi in ascissa (1-specificità). Dalla rappresentazione grafica è possibile notare l'attendibilità del marcatore selezionato, la curva interpolata, infatti, tende a coincidere con gli assi cartesiani.

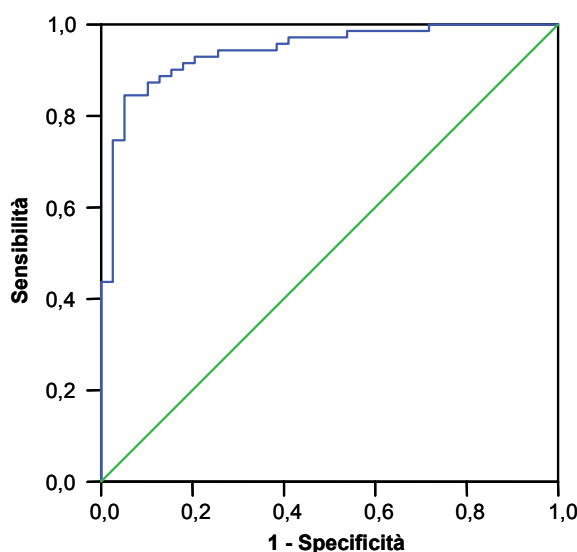


Figura 6. Curva ROC per il Si nel siero

Sangue

I dati relativi alla concentrazione degli elementi nel sangue sono riportati in Tabella 14. Nel sangue dei pazienti MP è stata osservata una concentrazione compresa fra 0,1 e 1 ng mL⁻¹ per Be, Cd, Co, Cr e V - con un valore più basso riscontrato per V ($0,11 \pm 0,07$ ng mL⁻¹) e uno più elevato per Cd ($0,77 \pm 0,32$ ng mL⁻¹) - e una concentrazione compresa fra 1 e 15 ng mL⁻¹ per Al, Hg, Li, Ni e Mn (più basso è Ni con $4,36 \pm 3,13$ ng mL⁻¹). Per tutti gli altri elementi sono stati osservati valori molto maggiori che passano da $57,4 \pm 27,7$ ng mL⁻¹ per Pb a 428610 ± 70062 ng mL⁻¹ per Fe.

Gli elementi significativamente sbilanciati fra le due popolazioni risultano Al, Be, Ca, Cd, Co, Fe, Li, Mg, Ni, Si e Zn. Nella Figura 7 sono riportate le deviazioni percentuali della popolazione patologica da quella di controllo.

Tabella 14. Concentrazione (ng mL⁻¹) degli elementi nel sangue di pazienti MP e controlli

	Pazienti MP (n. 71)		Controlli (n. 43)	
	Media $\pm$ DS	25°-75°	Media $\pm$ DS	25°-75°
Al ^a	13,0 $\pm$ 11,2	4,51 – 18,7	18,1 $\pm$ 10,8	9,2 – 23,1
Be ^a	0,28 $\pm$ 0,19	0,14 – 0,39	0,41 $\pm$ 0,18	0,30 – 0,51
Ca ^a	48861 $\pm$ 9532	40565 – 56150	62870 $\pm$ 10051	56947 – 66388
Cd ^a	0,77 $\pm$ 0,32	0,51 – 1,01	1,06 $\pm$ 0,48	0,82 – 1,36
Co ^a	0,26 $\pm$ 0,12	0,17 – 0,32	0,12 $\pm$ 0,09	0,05 – 0,16
Cr	0,71 $\pm$ 0,59	0,23 – 1,18	0,48 $\pm$ 0,33	0,25 – 0,55
Cu	1042 $\pm$ 453	623 – 1327	946 $\pm$ 137	869 – 1030
Fe ^a	428610 $\pm$ 70062	362880 – 478254	547409 $\pm$ 49050	524453 – 574841
Hg	5,81 $\pm$ 3,77	2,90 – 8,42	5,85 $\pm$ 3,18	3,58 – 8,05
Li ^b	1,09 $\pm$ 0,76	0,49 – 1,59	0,74 $\pm$ 0,44	0,44 – 0,94
Mg ^a	31370 $\pm$ 4672	27767 – 34544	40235 $\pm$ 4967	38092 – 43134
Mn	8,57 $\pm$ 3,90	5,69 – 10,9	7,49 $\pm$ 3,48	5,41 – 9,49
Ni ^a	4,36 $\pm$ 3,13	1,40 – 6,55	0,97 $\pm$ 0,53	0,58 – 1,30
Pb	57,4 $\pm$ 27,7	35,8 – 70,0	50,9 $\pm$ 20,1	32,8 – 64,4
Si ^b	241 $\pm$ 166	119 – 338	154 $\pm$ 63	112 – 181
V	0,11 $\pm$ 0,07	0,07 – 0,14	0,09 $\pm$ 0,05	0,06 – 0,13
Zn ^a	5313 $\pm$ 977	4580 – 6092	6810 $\pm$ 787	6280 – 7286

^a: p < 0,001; ^b: p < 0,05.

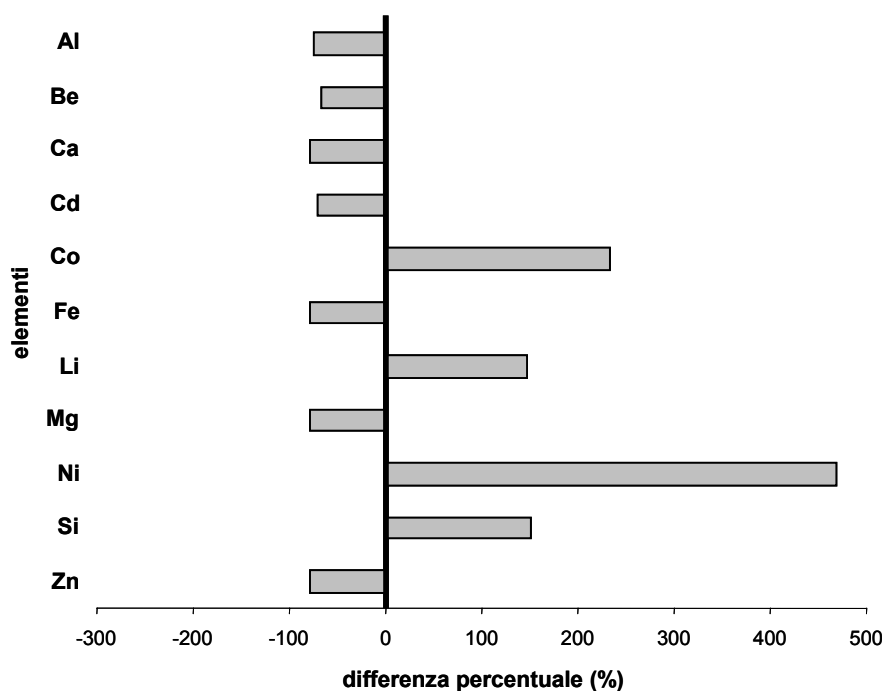


Figura 7. Deviazioni percentuali degli elementi nel sangue di malati rispetto ai controlli (0)

In particolare, sono state evidenziate nei pazienti concentrazioni maggiori di Co, Li, Ni e Si, con variazioni di $\approx 250\%$ per il Co e di $\approx 500\%$ per il Ni rispetto ai soggetti sani.

Anche in questo caso sui 17 elementi sono state valutate le differenze significative in funzione del sesso (Tabella 15).

Tabella 15. Concentrazione (ng mL⁻¹) degli elementi nel sangue di maschi (M) e femmine (F) nei pazienti e nei controlli

	Pazienti MP		Controlli	
	M (n. 53)	F (n. 18)	M (n. 33)	F (n. 10)
Al ^a	13,1 ± 12,0	12,8 ± 7,9	18,5 ± 11,3	16,7 ± 9,7
Be ^{a, b}	0,29 ± 0,19	0,25 ± 0,20	0,39 ± 0,17	0,50 ± 0,18
Ca ^{a, b, d}	48177 ± 9676	50876 ± 9054	61170 ± 9393	68484 ± 10587
Cd ^a	0,73 ± 0,32	0,86 ± 0,32	1,09 ± 0,52	0,97 ± 0,34
Co ^a	0,26 ± 0,12	0,24 ± 0,11	0,10 ± 0,07	0,17 ± 0,14
Cr	0,74 ± 0,61	0,62 ± 0,52	0,53 ± 0,35	0,33 ± 0,20
Cu ^d	1029 ± 473	1082 ± 399	926 ± 135	1011 ± 128
Fe ^{a, b}	427344 ± 70391	432337 ± 70970	555433 ± 48292	523336 ± 45306
Hg ^{b, c}	6,49 ± 3,71	3,94 ± 3,34	5,43 ± 2,78	7,20 ± 4,09
Li ^a	1,12 ± 0,76	1,04 ± 0,79	0,72 ± 0,39	0,83 ± 0,59
Mg ^{a, b}	30898 ± 4625	32757 ± 4660	39973 ± 5544	41073 ± 2347
Mn	8,81 ± 3,91	7,84 ± 3,90	7,20 ± 3,34	8,46 ± 3,96
Ni ^{a, b}	4,39 ± 3,30	4,28 ± 2,63	0,94 ± 0,51	1,09 ± 0,63
Pb ^{c, d}	63,2 ± 27,4	41,5 ± 22,3	56,2 ± 19,7	33,8 ± 9,1
Si ^{a, d}	245 ± 154	229 ± 204	144 ± 62	188 ± 56
V	0,11 ± 0,08	0,11 ± 0,04	0,10 ± 0,05	0,09 ± 0,04
Zn ^{a, b}	5265 ± 1047	5453 ± 741	6937 ± 794	6406 ± 640

^a: differenze significative tra M malati e sani; ^b: differenze significative tra F malate e sane; ^c: pazienti MP: F vs M; ^d: controlli; F vs M.

L'analisi dei dati conferma nei maschi MP rispetto ai controlli le differenze ottenute precedentemente ($p < 0,01$). Nelle femmine MP, Al, Cd, Co e Si non risultano statisticamente diversi rispetto alle femmine sane, mentre è presente una differenza significativa per il Hg ($p < 0,03$). All'interno della popolazione patologica, si riscontrano livelli minori di Hg e Pb nei maschi ($p < 0,005$) rispetto alle femmine. Nella popolazione sana, invece, risultano significativi i maggior valori di Ca, Cu e Si nelle femmine ($p < 0,05$) e di Pb nei maschi ($p < 0,001$).

Non sono emerse correlazioni significative tra il contenuto ematico degli elementi e i parametri clinici considerati. L'analisi discriminante (Lambda di Wilks = 0,274) ha selezionato 7 elementi, i cui coefficienti sono riportati in Tabella 16. In particolare Fe e Co risultano essere le principali variabili discriminanti tra i soggetti malati e sani.

Tabella 16. Coefficienti standardizzati della funzione discriminante

Elemento	Coefficiente standardizzato
Fe	0,633
Co	0,531
Al	0,474
Si	0,406
Cd	0,403
Ni	0,310
Be	0,276

Nella Tabella 17 è riportata la classificazione ottenuta con l'analisi discriminante. Il risultato prevede il 98,2% di casi originali correttamente classificati (100% per i controlli e 97,2% per i pazienti MP) e il 97,4% di casi cross-validati correttamente classificati (97,7% per i controlli e 97,2% per i pazienti MP).

Tabella 17. Classificazione nel sangue in base alla funzione discriminante

Tipo di classificazione		Stato	Attribuzione		Totali
			Pazienti (MP)	Controlli(CR)	
Originale	Conteggio (n.)	MP	69	2	71
		CR	0	43	43
	Percentuale (%)	MP	97,2	2,8	100,0
		CR	11,6	100,0	100,0
Cross-validato	Conteggio (n.)	MP	68	2	71
		CR	5	42	43
	Percentuale (%)	MP	97,2	2,8	100,0
		CR	2,3	97,7	100,0

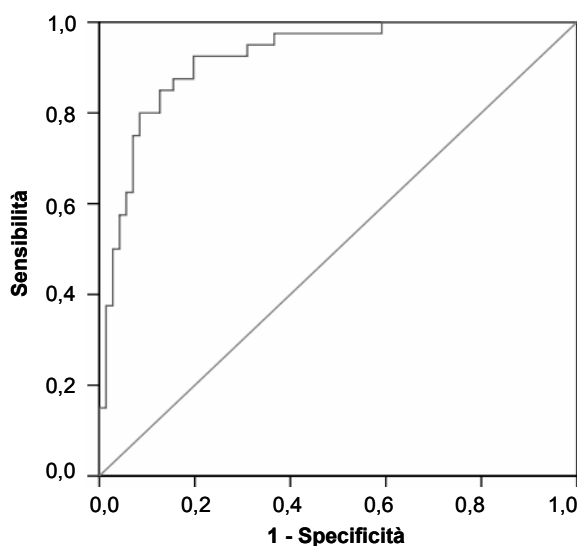
I parametri ottenuti dall'analisi ROC sono invece riportati in Tabella 18. Questi dati confermano la capacità discriminante di Fe e Co. Il valore di AUC pari a 0,92 per il Fe, infatti, indica questo elemento come marcatore altamente accurato, mentre il Co rappresenta un marcatore moderatamente accurato. I risultati riportati nella Tabella indicano che livelli più bassi rispetto al valore soglia per il Fe e più alti per il Co sono propri dello stato patologico.

In Figura 8 è raffigurata la relazione fra i parametri dell'analisi ROC e i livelli di Fe. Anche in questo caso è possibile notare come, essendo la curva del Fe asintotica con gli assi cartesiani, il test abbia un elevato valore informativo.

Tabella 18. Parametri dell'analisi ROC per il sangue

Elemento	AUC	ES	Intervallo di confidenza	Sensibilità	1-Specificità	Valore-soglia (ng mL ⁻¹)
Fe	0,92	0,03	0,87-0,97	0,91	0,20	514844
Co	0,85	0,04	0,77-0,92	0,85	0,30	0,15

ES: errore standard

**Figura 8. Curva ROC del Fe nel sangue**

Capelli

I dati relativi alla concentrazione degli elementi nei capelli sono riportati nella seguente Tabella 19.

Nei pazienti MP è stata osservata una concentrazione bassa solo per il Cd ($10,7 \pm 7,9$ ng g⁻¹) e una concentrazione compresa fra 100 e 1000 ng mL⁻¹ per Co, Cr, Mn e Pb (più basso, Co con 162 ± 157 ng g⁻¹). Per tutti gli altri elementi sono state rilevate concentrazioni molto maggiori che passano da 1222 ± 880 ng g⁻¹ per Hg a 375732 ± 239914 ng g⁻¹ per Ca. Differenze significative sono emerse solo per Pb e Fe, che presentano valori più bassi nei soggetti MP, con deviazioni percentuali di circa il 30% rispetto ai controlli. Anche in questo caso sono stati valutati i diversi livelli dei metalli in funzione del sesso, come riportato in Tabella 20.

Tabella 19. Concentrazione (ng g⁻¹) degli elementi nei capelli di pazienti MP e controlli

	Pazienti MP (n. 81)		Controlli (n. 17)	
	Media $\pm$ DS	25°-75°	Media $\pm$ DS	25°-75°
Al	3065 $\pm$ 2189	1632 – 4376	2578 $\pm$ 1480	1128 – 4025
Ca	375732 $\pm$ 239914	218547 – 440650	418841 $\pm$ 227515	155084 – 578485
Cd	10,7 $\pm$ 7,9	4,40 – 13,8	8,4 $\pm$ 4,7	5,1 – 10,6
Co	162 $\pm$ 157	52,6 – 215	227 $\pm$ 254	48,9 – 376
Cr	240 $\pm$ 154	126 – 316	226 $\pm$ 129	141 – 263
Cu	7907 $\pm$ 2913	6241 – 9431	7487 $\pm$ 3413	5510 – 8096
Fe^a	9512 $\pm$ 4903	6409 – 10525	13096 $\pm$ 7106	7710 – 16977
Hg	1222 $\pm$ 880	692 – 1504	1367 $\pm$ 1008	567 – 1978
Mg	36370 $\pm$ 23584	19146 – 53386	43306 $\pm$ 29142	20056 – 69393
Mn	645 $\pm$ 503	202 – 997	526 $\pm$ 533	204 – 668
Pb^a	596 $\pm$ 629	197 – 737	848 $\pm$ 706	284 – 1319
Si	28174 $\pm$ 19160	13570 – 36974	29395 $\pm$ 18179	15552 – 38274
Zn	141703 $\pm$ 47577	98359 – 177621	130867 $\pm$ 47176	106254 – 163493

^a: $p < 0,05$.

Tabella 20. Concentrazione (ng g⁻¹) degli elementi nei capelli di maschi (M) e femmine (F) nei pazienti e nei controlli

	Pazienti MP		Controlli	
	M (n. 62)	F (n. 19)	M (n. 9)	F (n. 8)
Al	3142 $\pm$ 2381	2834 $\pm$ 1509	2756 $\pm$ 1554	2401 $\pm$ 1504
Ca^{a, b}	333 $\pm$ 211	536 $\pm$ 278	357 $\pm$ 227	512 $\pm$ 212
Cd	10,7 $\pm$ 8,30	10,5 $\pm$ 6,5	6,68 $\pm$ 3,87	11,2 $\pm$ 4,90
Co^d	163 $\pm$ 156	156 $\pm$ 166	303 $\pm$ 238	129 $\pm$ 257
Cr	227 $\pm$ 146	279 $\pm$ 176	247 $\pm$ 166	202 $\pm$ 75
Cu	7,65 $\pm$ 2,92	8,73 $\pm$ 2,81	6,53 $\pm$ 2,02	8,71 $\pm$ 4,53
Fe^c	9110 $\pm$ 4550	10800 $\pm$ 5850	15900 $\pm$ 7730	9450 $\pm$ 4360
Hg	1256 $\pm$ 908	1123 $\pm$ 808	1548 $\pm$ 1219	1136 $\pm$ 668
Mg^{a, b}	32,1 $\pm$ 22,0	51,3 $\pm$ 23,6	30,5 $\pm$ 22,4	59,3 $\pm$ 29,9
Mn	627 $\pm$ 466	697 $\pm$ 610	705 $\pm$ 652	295 $\pm$ 178
Pb^d	646 $\pm$ 651	444 $\pm$ 547	756 $\pm$ 632	941 $\pm$ 807
Si	28,1 $\pm$ 20,0	28,4 $\pm$ 17,0	24,8 $\pm$ 13,1	33,4 $\pm$ 21,8
Zn	145 $\pm$ 47	131 $\pm$ 47	131 $\pm$ 56	130 $\pm$ 37

^a: pazienti MP: F vs M; ^b: controlli: F vs M; ^c: differenze significative fra M malati e sani; ^d: differenze significative fra F malate e sane.

È confermata nei maschi MP la significatività delle differenze del contenuto di Fe rispetto ai controlli ($p < 0,001$), mentre nelle femmine MP si evidenziano come significativi i maggior livelli di Co ($p = 0,04$) e Pb ($p < 0,05$). Le femmine sia sane che malate presentano livelli più alti di Ca e Mg (entrambi con $p < 0,05$) rispetto ai maschi. Le correlazioni fra livelli di analiti nei capelli e parametri relativi alla malattia sono presentate in Tabella 21.

Tabella 21. Correlazioni tra contenuto di elementi nei capelli e parametri clinici

Elemento	Età	Gravità	Durata
Ca	$p = 0,03$; $\rho = -0,31$		
Hg			$p = 0,04$; $\rho = -0,26$
Pb		$p = 0,02$; $\rho = -0,30$	$p = 0,02$; $\rho = -0,30$

Gli analiti riportati in Tabella 21 correlano tutti inversamente con i parametri clinici studiati e la durata della malattia è il fattore maggiormente influenzante. Il Pb risulta essere l'elemento più suscettibile alle variabili considerate.

Anche su questa matrice è stata applicata l'analisi discriminante i cui risultati non sono però stati ritenuti attendibili, probabilmente a causa della diversa dimensione dei due gruppi in esame. In aggiunta, anche l'analisi ROC non si è dimostrata un valido mezzo di indagine in quanto le curve ottenute non sono risultate significative. Un ampliamento del gruppo di controllo potrebbe dare risultati più soddisfacenti per l'applicazione di analisi di tipo multivariato.

Valutazione dello stress ossidativo

In tutti i soggetti è stato valutato il danno ossidativo sia in termini di stato ossidativo SOS che di capacità antiossidante SAC. Lo squilibrio ossidativo è risultato essere significativo ($p < 0,001$) per entrambe le variabili. Sono riportati nella Tabella 22 sia i valori ottenuti dall'analisi delle due popolazioni che quelli ottenuti separando i soggetti in funzione del sesso.

Tabella 22. Valori di SOS e SAC nei gruppi di popolazione in esame

Popolazione	SOS (U.CARR)	SAC ($\mu\text{mol mL}^{-1}$ di HClO)
Pazienti MP	317 $\pm$ 54	321 $\pm$ 48
Controlli	273 $\pm$ 44	368 $\pm$ 74
Pazienti maschi	315 $\pm$ 52	320 $\pm$ 49
Controlli maschi	263 $\pm$ 34	358 $\pm$ 33
Pazienti femmine	322 $\pm$ 61	324 $\pm$ 46
Controlli femmine	303 $\pm$ 57	397 $\pm$ 136

I livelli di produzione dei ROS e la capacità di resistere a tali sostanze della nostra popolazione di controllo sono in accordo con gli intervalli di normalità usualmente riscontrati. Poiché valori compresi fra 250-300 U.CARR indicano stato ossidativo normale, si evidenzia, seppur in modo non molto marcato, una maggiore produzione di ROS nei pazienti; mentre i minori livelli di SAC trovati nei pazienti rispetto alla condizione di normalità (ca. 350 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ di HClO) indicano decremento della capacità antiossidante. Separando le due popolazioni in base al sesso la significatività sopramenzionata permane evidente soltanto nei maschi ($p <$

0,05): maggiore SOS e più bassa SAC per i soggetti MP rispetto ai controlli. Nelle Figure 9-10 sono rappresentati gli andamenti ottenuti in termini di mediana e di 5°-25°-75°-95° percentile rispettivamente per SOS e SAC. Anche graficamente è evidente lo squilibrio fra la maggior produzione dei ROS nei soggetti patologici e la corrispettiva diminuzione della capacità degli stessi soggetti patologici a resistere alla produzione dei radicali.

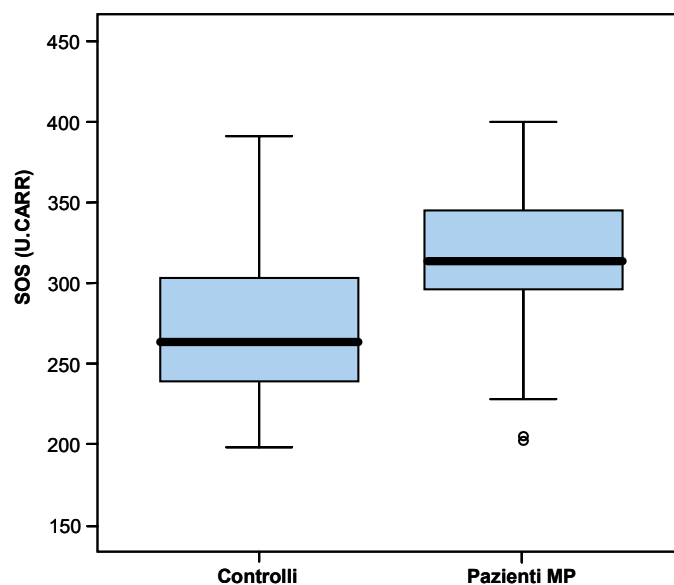


Figura 9. Box-plot dell'andamento di SOS nelle due popolazioni

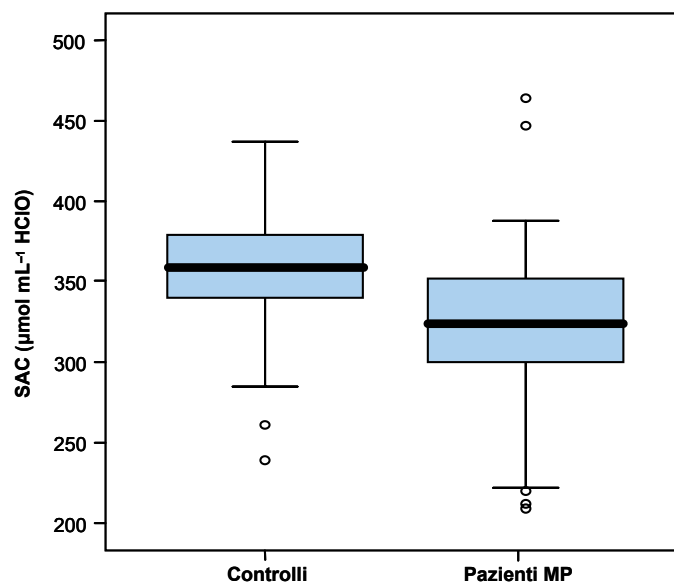


Figura 10. Box-plot dell'andamento di SAC nelle due popolazioni

Evidenze presenti in letteratura

I risultati ottenuti per ogni elemento sono di seguito discussi ed esaminati anche in confronto a quanto presente in letteratura, come riportato in Tabella 23. Le frecce nella tabella stanno ad indicare gli sbilanciamenti statisticamente significativi trovati dai diversi Autori nel contenuto di metalli tra popolazioni patologiche e rispettivi controlli. Si nota come, in effetti, gli studi sull'argomento siano relativamente poco numerosi a testimonianza anche delle difficoltà tecniche-analitiche legate alla loro realizzazione.

Tabella 23. Dati di questo studio e dati presenti in letteratura

Elemento	CSF	Siero	Sangue	Capelli
Al	= Questo studio	= Questo studio ↓ Hegde (181)	↓ Questo studio	= Questo studio
Be	= Questo studio	= Questo studio	↓ Questo studio	nd
Ca	= Questo studio	↑ Questo studio ↑ Hegde (181)	↓ Questo studio	= Questo studio ↓ Kikkawa (174)
Cd	= Questo studio	↓ Questo studio	↓ Questo studio	= Questo studio
Co	↓ Questo studio	↓ Questo studio = Jiménez-Jiménez (126)	↑ Questo studio	= Questo studio
Cr	↓ Questo studio = Aguilar (100) = Jiménez-Jiménez (176)	= Questo studio = Aguilar (100) = Jiménez-Jiménez (126) = Jiménez-Jiménez (176)	= Questo studio	= Questo studio
Cu	= Questo studio = Gazzaniga (177) ↑ Pall (180)	= Questo studio ↑ Hegde (181) = Jiménez-Jiménez (178) ↑ Kocatürk (182) = Tórsdóttir (179)	= Questo studio	= Questo studio
Fe	↓ Questo studio = Gazzaniga (177) = Jiménez-Jiménez (176) = Pall (180)	↓ Questo studio = Cabrera-Valdivia (184) ↓ Hegde (181) = Jiménez-Jiménez (176) = Tórsdóttir (179)	↓ Questo studio	↓ Questo studio
Hg	= Questo studio	= Questo studio	= Questo studio ↑ Ngim (135)	= Questo studio ↑ Ngim (135)
Li	= Questo studio	↓ Questo studio	↑ Questo studio	nd
Mg	= Questo studio	↑ Questo studio ↑ Hegde (181)	↓ Questo studio	= Questo studio
Mn	= Questo studio = Gazzaniga (177) = Jiménez-Jiménez (176) = Pall (180)	= Questo studio ↑ Hegde (181) = Jiménez-Jiménez (126) = Jiménez-Jiménez (176)	= Questo studio	= Questo studio
Ni	↓ Questo studio	↑ Questo studio	↑ Questo studio	nd
Pb	↓ Questo studio	= Questo studio	= Questo studio	Questo studio
Si	↓ Questo studio	↑ Questo studio ↑ Hegde (181)	↑ Questo studio	= Questo studio
V	= Questo studio	↑ Questo studio	= Questo studio	nd
Zn	= Questo studio ↓ Jiménez-Jiménez (176)	↓ Questo studio ↓ Hegde (181) = Jiménez-Jiménez (178) = Jiménez-Jiménez (176) = Kocatürk (182)	↓ Questo studio	= Questo studio

nd: non disponibile; ↓: valori inferiori ai propri controlli; ↑: valori superiori ai propri controlli; =: valori comparabili ai propri controlli.

Per quanto riguarda l'Al, sebbene siano state riportate deposizioni di tale metallo in specifiche regioni dell'SNC interessate da MP (105, 121), non è stata evidenziata un'associazione marcata fra la patologia e il contenuto di Al nei fluidi biologici. Tale andamento è confermato anche nel presente studio con livelli normali in quasi tutte le matrici analizzate, eccetto che nel sangue dove è visibile un leggero decremento. Anche la distribuzione di Ca nei fluidi periferici di pazienti con disordini neurodegenerativi è poco conosciuta. Dal monitoraggio dei fluidi nel nostro studio il coinvolgimento di Ca nella patologia rimane poco chiaro, dal momento che questo elemento presenta livelli incrementati nel siero ma diminuiti nel sangue, rispetto alla situazione di normalità. Ciò testimonierebbe di un diverso comportamento nel sangue dei soggetti patologici del contenuto di Ca intra ed extra-cellulare. I dati raccolti da Kikkawa mostrano un decremento del contenuto di Ca nei capelli che questo studio non conferma (174). La correlazione del Cd con i disordini neurodegenerativi è stabilita sia per le sue proprietà ossidanti sia per la sua capacità di interferire con enzimi detossificanti, come le SOD. Nel nostro studio sono stati ottenuti livelli di Cd normali nel CSF e diminuiti nel comparto ematico. Al contrario, in soggetti con disordini ai neuroni motori i livelli sierici riscontrati da Pamphlett *et al.* sembrano essere maggiori nei pazienti (175). Pochi sono i gruppi che si sono interessati di Co al di fuori dei problemi della medicina occupazionale, sebbene sia stato dimostrato che il Co induce a livello dell'SNC la formazione di fibrille di α -sinucleina, suggerendo un ruolo rilevante nella patogenesi dell'MP. I nostri dati nel CSF potrebbero suggerire un coinvolgimento di tale metallo. A livello periferico (eccetto che nei capelli) sembra esistere una correlazione fra Co e patologia nonostante altri non hanno evidenziato questo andamento (126). Per quanto riguarda il Cr, i nostri dati e quelli presenti in letteratura (100, 126, 176) non presentano valori anormali a livello ematico. Mentre nel CSF è stata evidenziata una diminuzione, sebbene non supportata da studi precedenti (100, 176). Nel presente studio il Cu non risulta un buon indicatore della patologia. Su tale elemento le evidenze della letteratura sono contrastanti perché, mentre alcuni autori trovano livelli normali nell'MP (177-179), altri riportano un aumento nel CSF (180) e nel siero (181, 182). Secondo uno studio condotto da Boll *et al.* sembra che il possibile legame fra Cu e MP non sia dovuto alla forma libera del metallo ma all'attività ferrossidasica della ceruloplasmina che risulta diminuita nel CSF dei soggetti malati (183). Nel caso del Fe sono stati dimostrati incrementi a livello di regioni dell'SNC in diverse malattie neurodegenerative, tra cui l'MP. A livello dei fluidi biologici, in questo studio è dimostrato un significativo decremento di Fe. Anche in tessuti come il capello tale diminuzione è ancora visibile. Questi andamenti supportano l'ipotesi, già proposta, che la sorgente per gli incrementi di Fe nel cervello sia il siero o il CSF. Un altro lavoro ha osservato decrementi di Fe nel siero (181), altri autori, invece, non hanno riscontrato uno sbilanciamento del Fe nella malattia (176, 177, 179, 180, 184). Per il Hg, sebbene alcuni autori riportino alti livelli di Hg nel sangue come parametri biochimici per una diagnosi precoce per l'MP (135), i nostri dati non indicano variazioni utili per definire lo stato patologico. Vari tipi di neurodegenerazioni sembrano essere associate ad una insufficienza di Mg nel cervello (121, 185). La concentrazione liquorale ritrovata nel nostro studio è simile per le due popolazioni. Anche nel comparto ematico il comportamento del Mg rispecchia quello del Ca, maggiore, cioè, nel siero – come riscontrato da Hegde *et al.* (181) – e più basso nella parte cellulare dei soggetti patologici.

Anche se fino a pochi anni fa il Mn era considerato come possibile fattore scatenante l'MP, oggi risulta chiaro che quelle sindromi erano dovute ad intossicazioni (manganismo) e avessero poca connessione con il danneggiamento nigro-striatale caratteristico dell'MP. A conferma di ciò, nel presente studio, come anche in letteratura, tutti i dati nei fluidi biologici non evidenziano un coinvolgimento diretto con l'MP (126, 176, 177, 180). La tossicità del Ni è stata ampiamente associata a fenomeni allergici da contatto, piuttosto che a meccanismi di neurotossicità. Tuttavia è noto che nei neuroni, insieme con altri elementi quali Cd, Co e Pb, il

Ni interferisce con i canali ionici che trasportano il Ca (138). I risultati ottenuti mostrano una diminuzione significativa nel CSF, mentre nel sangue e nel siero l'elemento tende ad accumularsi. Il legame del Pb con i fenomeni di neurodegenerazione è documentato principalmente in seguito a esposizione occupazionale e/o ambientale (186). In questo lavoro, il decremento di Pb marcato nel CSF è meno evidente nei capelli risulta essere un utile parametro di discriminazione fra lo stato patologico e sano, ma non esistono dati in letteratura che supportano tale risultato. Il coinvolgimento del Si in varie patologie neurologiche è indicato dalla presenza di complessi allumino-silicati negli intrecci neurofibrillari del tessuto cerebrale (166, 167). È stato suggerito, inoltre, che l'elevata presenza di Si è in grado di attuare un meccanismo protettivo contro l'assorbimento intestinale dell'Al (168). I nostri dati indicano aumentati livelli di Si nel compartimento ematico dei pazienti, ma livelli più bassi nel CSF. Tale distribuzione del Si potrebbe essere attribuibile alla continua assunzione come eccipiente delle formulazioni dei farmaci assunti per la terapia anti-MP, anche se nei nostri pazienti non è stata rilevata una correlazione tra Si e terapia. L'unico altro dato a disposizione è quello di Hegde *et al.* (181) che riscontra incrementate concentrazioni di Si nel siero dei parkinsoniani. Per quanto concerne lo Zn è nota la sua azione nel contrastare lo stress ossidativo. Nel compartimento ematico abbiamo evidenziato valori più bassi rispetto alla normalità, confermando uno studio precedente (181), e concentrazioni non alterate nel CSF, in contrasto con quanto riportato da Jiménez-Jiménez (176). Come per il Fe, questi dati danno informazione dell'esistenza di un legame tra omeostasi dell'elemento nel cervello e suo contenuto nel CSF e nel siero. La diminuita concentrazione rilevata di Zn tende a confermare l'osservazione che i nostri pazienti non presentano un'adeguata capacità di contrastare lo stress ossidativo. Il coinvolgimento di Be, Li e V nell'MP è poco conosciuto e controverso: alcuni studi su animali e pazienti MP riportano effetti del Li sul sistema dopaminergico (187), mentre uno studio *in vivo* evidenzia l'inibizione da parte del V di alcuni enzimi detossificanti come la GPO con successiva produzione dei radicali liberi (188). Anche le alterazioni riscontrate per questi tre elementi nei nostri soggetti patologici non escludono un loro legame con la malattia.

CONCLUSIONI

C'è una crescente evidenza che l'alterata omeostasi di alcuni metalli giochi un ruolo cruciale nella patogenesi di molti disordini neurodegenerativi. Allo stato attuale delle conoscenze, non esistono dati dettagliati sull'omeostasi dei metalli e sulle loro interazioni reciproche e non è chiaro se le alterazioni degli elementi che si possono evidenziare siano causa o conseguenza della patologia. La ridotta conoscenza di un quadro generale sui livelli di elementi nell'organismo patologico è dovuta anche alle difficoltà tecnico-analitiche relative alla loro determinazione nei fluidi biologici.

Le procedure analitiche sviluppate in questo studio si sono dimostrate pienamente capaci di effettuare un monitoraggio con eccellente accuratezza e precisione. Le tecniche utilizzate, infatti, affiancano alla capacità di quantificazioni multi-elementari la possibilità di poter testare un consistente numero di campioni, mantenendo nel contempo elevate qualità analitiche. Questo ci ha permesso di ottenere un'immagine del quadro elementare coinvolto nel morbo di Parkinson allargata a 17 elementi.

Il monitoraggio effettuato con tali premesse analitiche sembra indicare una serie di alterazioni correlate alla malattia. In particolare è evidenziabile principalmente il coinvolgimento di Ca, Co, Fe, Mg, Pb e Si. I minori livelli di Fe trovati in tutte le matrici studiate potrebbero indicare un probabile accumulo nell'SNC che contribuisce a causare l'elevato stress ossidativo riscontrato nella SNpc dei soggetti parkinsoniani. Il Ca e Mg risultano fortemente sbilanciati nel compartimento ematico: entrambi sono aumentati nel siero e diminuiti nel sangue indicando, principalmente, un accumulo a livello extracellulare. In aggiunta, il Si appare aumentato nel sistema ematico, mentre la diminuzione osservata nel CSF potrebbe essere dovuta all'efficienza della barriera emato-encefalica nel contrastarne il passaggio. La presenza di un elevato stress ossidativo supporta l'ipotesi che alcuni meccanismi pro-ossidanti sono aumentati in condizione di neurodegenerazione. Le analisi statistiche multivariate ci hanno permesso di definire l'insieme di quegli elementi che possono contribuire al quadro clinico-patologico del Parkinson. A tal proposito, l'analisi discriminante e l'analisi ROC hanno evidenziato che il gruppo di elementi coinvolti nella classificazione di soggetti MP varia in base al fluido biologico considerato. In particolare, le concentrazioni di Fe sembrano essere importanti nel sangue e capelli insieme ai livelli di Co nel sistema ematico e a quelli di Pb nel liquor e capelli. Rimane, ovviamente, da approfondire il significato di tali differenze e di come eventuali interazioni possano contribuire a identificare il quadro clinico-patologico lungo la progressione dell'MP.

BIBLIOGRAFIA

1. Olanow CW, Tatton WG. Etiology and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Annual Rev Neurosci* 1999;22:123-44.
2. Hornykiewicz O, Kish SJ. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1986;45:19-34.
3. Semchuk KK, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease: A test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology* 1993;46(6):1173-80.
4. Taylor CA, Sainte-Hilaire MH, Cupples LA, Thomas CA, Burchard AE, Feldman RG, Myers RH. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: A new England-based case control study. *Am J Med Genet* 1999;88(6):742-9.
5. Gowers WR. *A manual of disease of the nervous system*. Philadelphia: Blackiston; 1888.
6. Patrick HU, Levy PM. Parkinson's disease. A clinical study of one hundred and forty-six cases. *Arch Neurol Psichiat* 1922;7:711-20.
7. Poskanzer DC, Schwab RS. Cohort analysis of Parkinson's disease: evidence for a single etiology related to subclinical infection. *J Chronic Dis* 1963;16:961-73.
8. Davis GC, William AC, Markley SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meripidine analogues. *Psychol Res* 1979;1:249-54.
9. Langston JW, Ballard PA, Tetrud JW, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meripidine-analog synthesis. *Science* 1983;219:979-80.
10. Calne DB, Langston JW. Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet* 1983;2(8365-66):1457-9.
11. Duvoisin RV, Golbe LI. Kindreds of dominantly inherited Parkinson's disease: Keys to the riddle. *Ann Neurol* 1995;38:355-66.
12. Lai BCL, Marion SA, Teschke K. Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinson's Rel Dis* 2002;8:297-309.
13. Jiménez-Jiménez FJ, Mateo D, Gimenez-Roldan S. Exposure to well water and pesticides in Parkinson's disease: a case control study in the Madrid area. *Movement Disord* 1992;7(2):149-52.
14. Gorell JM, Jhonson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ. The risk of Parkinson's disease with exposure to the pesticides, farming, well water and rural living. *Neurology* 1998;50(5):1346-50.
15. Gassner B, Wuthrich A, Scholtysik G, Solioz M. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. *J Pharmacol Exper Ther* 1997;28:855-60.
16. Greenmyre JT, MacKenzy G, Peng T, Stephans SE. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp* 1999;66:85-97.
17. Hodgson E, Levi PE. Pesticides: an important but under used model for the environmental health sciences. *Environ Health Persp* 1996;104:97-106.
18. Di Ilio C, Sacchetta P, Angelucci S, Bucciarelli T, Pennelli A, Mazzetti AP. Interaction of glutathione transferase Pl-1 with captan and captofol. *Biochem Pharmacol* 1996;52:43-8.
19. Thiruchelvam M, Brockel B, Richfield E, Baggs R, Cory-Slechta D. Potentiated and preferential effect of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine system: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res* 2000;873:225-34.
20. Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL. Occupational metal exposure and the risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology* 1999;18:303-8.

21. Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Kortsha GX, Brown GG, Richardson RJ. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 1999-b;20(2-3):239-47.
22. Rybicki BA, Johnson CC, Peterson EL, Kortsha GX, Gorrel JM. A family history of Parkinson's disease and its effects on other Parkinson's disease risk factors. *Neuroepidemiology* 1999;18(5):270-8.
23. Zayed, J, Ducic S, Campanella G, Panniset JC, Andre P, Masson H, Roy M. Facteurs environnementaux dans l'etiologie de la maladie de Parkinson. *Can J Neurol Sci* 1990;17:286-91.
24. Uversky VN, Li J, Bower K, Fink AL. Synergistic effects of pesticides and metals on the fibrillation of α -synuclein: implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2002;23:527-36.
25. Hubble JP, Cao T, Hassanein RE, Neuberger JS, Koller WC. Risk factors for Parkinson's disease. *Neurology* 1993;43(9):1963-7.
26. Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC. Environmental risk factors for Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 1997;48(6):1583-8.
27. Metzler DF. Health impact of organics in ground water. *Am J Public Health* 1982;72:1375-84.
28. Johnson C, Gorell J, Rybicki B, Sanders K, Peterson E. Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease. *Int J Epidemiol* 1999;28(6):1102-9.
29. Anderson C, Checkoway H, Franklin JM, Beresford S, Smith-Weller T, Swanson PD. Dietary factors in Parkinson's disease: the role of food groups and specific foods. *Movement Disord* 1999;14(1):21-7.
30. Fall PA, Fredrikson M, Axelson O, Granerus AK. Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden. *Movement Disord* 1999;14(1):28-37.
31. Morens DM, Grandinetti A, Waslien CI, Park CB, Ross GW, White LR. Case-control study of idiopathic Parkinson's disease and dietary vitamin E intake. *Neurology* 1996;46(5):1270-4.
32. Hellenbrand W, Seidler A, Boeing H, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Schneider E, Ulm G. Diet and Parkinson's disease I: a possible role of the past intake of specific foods and food group. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a case control study. *Neurology* 1996;47(3):636-43.
33. Benedetti MD, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA. Smoking, alcohol and coffee consumption preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Neurology* 2000;55:1350-8.
34. Gorell JM, Rybicki BA, Johnson CC, Peterson EL. Smoking and Parkinson's disease: a dose-response relationship. *Neurology* 1999-c;52(1):115-9.
35. Grandinetti A, Morens DM, Reed D, MacEachern D. Prospective study of cigarette smoking and the risk of developing idiopathic of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 1994;139(12):1129-38.
36. Janson AM, Fuxe K, Goldstein M. Differential effects of acute and chronic nicotine treatment on MTPT (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons in the black mouse. *Clin Investig* 1992;70(3-4):232-8.
37. Baron JA. Cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology* 1986;36(11):1490-6.
38. Singer TP, Castagnoli N, Ramsay RR, Trevor AJ. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine. *J Neurochem* 1987;49:1-8.
39. Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R, Langston JW. Parkinson's disease in twin: an etiology study. *J Am Med Assoc* 1999;281(4):341-6.

40. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SF, Di Iorio G, Sanges ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4 q21-q23. *Science* 1996;52:978-80.
41. Polymeropoulos MH, Lavaden C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-7.
42. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalia D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding α -sinuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18:106-8.
43. Poser CM, Huntley CJ, Poland JD. Para-encephalitic parkinsonism. *Acta Neurol Scand* 1969;45:199-215.
44. Isgreen WP, Chutorian AM, Fahn S. Sequential parkinsonism and chorea following mild influenza. *Trans Am Neurol Assoc* 1976;101:56-60.
45. Mellon AF, Appleton RE, Gardner-Medwin D, Aynsley-Green A. Encephalitis lethargica-like illness in a five-year-old. *Develop Med Child Neurol* 1991;33:158-61.
46. Solbrig MV, Nashef L. Acute parkinsonism in suspected herpes simplex encephalitis. *Movement Disord* 1993;8:233-4.
47. Mintz M, Tardieu M, Hoyt L. Levodopa therapy improves motor function in HIV-infected children with extrapyramidal syndrome. *Neurology* 1996;47:1583-5.
48. Abrey LE, Waters CH. Basal ganglia calcification after mumps encephalitis. *Movement Disord* 1996;11:755-6.
49. Hubble JP, Cao T, Kjelstrom JA, Koller WC, Beaman BL. Nocardia species as an etiologic agent in Parkinson's disease: serological testing in a case-control study. *J Clin Microbiol* 1995;33(10):2768-9.
50. Takahashi M, Yamada T, Nakajima S, Nakajima K, Yamamoto T, Okada H. The substantia nigra is major target for neurovirogent influenza A virus. *J Exper Med* 1995;181:2161-9.
51. Tsui JK, Calne DB, Wang Y, Schulzer M, Marion SA. Occupational risk factors in Parkinson's disease. *Can J Public Health* 1999;5:334-7.
52. Martyn CN. Infection in childhood and neurological diseases in adult life. *Br Med Bull* 1997;53(1):24-39.
53. Schwab RS, England AC. Parkinsonism due to various specific causes. In: Vinken PJ, Bruyn GW (Ed.). *Handbook of clinical neurology*. Amsterdam: North-Holland Publishing Co; 1968. p. 230-3.
54. Factor SA, Weiner WJ. Prior history of head trauma in Parkinson's disease. *Movement Disord* 1991;6(3):225-9.
55. Stern MB. Head trauma as a risk factors for Parkinson's disease. *Movement Disord* 1991;6(2):95-7.
56. Davie CA, Pirtosek Z, Barker GJ, Kingsley DPE, Miller PH, Lees AL. Magnetic resonance spectroscopic study related to boxing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;58:688-91.
57. Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci* 1985;8:22-9.
58. Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci* 1993;16:439-44.
59. Olanow CW. Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology* 1990;40:32-7.
60. Ebadi M, Govitrapong P, Sharma S, Muralikrishnan D, Shavali S, Pellet L, Schafer R, Albano C, Eken J. Ubiquinone (Coenzyme Q₁₀) and the mitochondria in oxidative stress of Parkinson's disease. *Biol Signals Recept* 2001;10:224-53.

61. Ben Shachar D, Riederer P, Youdim MBH. Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implication for PD. *J Neurochem* 1991;57:1609-14.
62. Zecca L, Tampellini D, Gatti A, Crippa R, Eisner M, Sulzer D, Ito S, Fardello R, Gallorini M. The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals. *J Neural Transm* 2000;109:663-72.
63. Sancesario G, Morello M, Reiner A, Giacomini P, Massa R, Schoen S, Bernardi G. Nitroergic neurons make synapses on dual-input dendritic spines of neurons in the cerebral cortex and the striatum of the rat: implication for a post synaptic action of nitric oxide. *Neuroscience* 2000;99(4):627-42.
64. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991;14:60-7.
65. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1989;52:381-9.
66. Selley ML. (E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Free Rad Biol Med* 1998;25(2):169-74.
67. Floor E, Wetzel MG. Increased protein oxidation in human *substantia nigra pars compacta* in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem* 1998;70:268-75.
68. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23-38.
69. Sanchez-Ramos J, Overvik E, Ames BN. A marker of oxyradical-mediated DNA damage (8-hydroxy-2'-Deoxyguanosine) is increased in nigro striatum of Parkinson's disease brain. *Neurodegeneration* 1994;3:197-204.
70. Montgomery EB. Heavy metals and the aetiology of PD and other movement disorders. *Toxicology* 1995;97:3-9.
71. Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Kortsha GX, Brown GG, Richardson RJ. Occupational exposure to metals as risk factors for Parkinson's disease. *Neurology* 1997;48(3):650-8.
72. Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, Longstreth WT, Swanson PD, Checkoway H. Parkinson's disease risks associated with dietary iron, manganese, and other nutrient intakes. *Neurology* 2003;60:1761-6.
73. Golts N, Snyder H, Frasier M, Theisler C, Choi P, Wolozin B. Magnesium inhibits spontaneous and iron-induced aggregation of α -synuclein. *J Biol Chem* 2002;277:16116-23.
74. Alfrey AC. Aluminium intoxication recognition and treatment. In: Nicolini M, Zatta P, Corain B (Ed.). *Aluminium in chemistry, biology and medicine*. Raven Press, New York; 1991. p. 73-84.
75. Roskams AJ, Connor JR. Aluminium access to the brain: a role for a transferring and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9024-27.
76. Good PF, Olanow CV, Perl DP. Neuromelanin- containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminium in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain Res* 1992;593:343-6.
77. Gutteridge JMC, Quinlan GJ, Clark IA, Halliwell B. Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochim Biophys Acta* 1985;35:441-7.
78. Méndez-Alvarez E, Soto-Otero R, Hermida-Ameijeiras A, Lopez-real AM, Labandiera-Garcia JL. Effects of aluminium and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxidopamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2001;1586:155-68.

79. Bolla KI, Briefel G, Spector D, Schwartz BS, Wieler L, Herron J, Gimenez L. Neurocognitive effects of aluminium. *Arch Neurol* 1992;49:1021-26.
80. Gerhardson L, Englyst V, Lundstrom NG, Sandberg S, Nordberg G. Cadmium, copper and zinc in tissue decreased copper smelter workers. *J Trace Elem Med Biol* 2002;16:261-6.
81. Hassoun EA, Sthods SJ. Cd-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J77A.1 cell cultures. *Toxicology* 1996;112:219-26.
82. Beyersmann D, Hechtenberg S. Cadmium, gene regulation, and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;144:247-61.
83. Hussain T, Shukla GS, Chandra SV. Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and vitro studies. *Pharmacol Toxicol* 1987;60:355-8.
84. Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced Hepatotoxicity and renal toxicity protection by antioxidant. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;154:256-63.
85. Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, Kaminska T, Snieszko R, Abramczyk D, Filar J, Kandefer-Szerszen M. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 2000;145:159-71.
86. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanism in the toxicity of metals ions. *Free Radic Biol Med* 1995;18:321-36.
87. Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KMK. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Rad Biol Med* 2004;36(11):1434-43.
88. Webster WS, Valois AA. The toxic effects of cadmium on the neonatal mouse CNS. *J Neuropathol Exp Neurol* 1981;40:247-57.
89. Das KP, Das PC, Dasgupta S, Dey CD. Serotonergic-cholinergic neurotransmitters function in brain during cadmium exposure in protein restricted rat. *Biol Trace Elem Res* 1993;36:119-27.
90. Okuda B, Iwamoto Y, Tachibana H, Sugita M. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. *Clin Neurol Neurosurg* 1997;99:263-5.
91. Nelson SR, Foltz FM. Hypocalcaemia and motor degeneration in parathyroidectomized frogs. *Exp Neurol* 1983, 79:763-72.
92. Cross AJ, Crow TJ, Dawson JM. Subcellular pathology of human neurodegeneration disorders: Alzheimer-type dementia and Huntington's disease. *J Neurochem* 1986;47:882-9.
93. Garruto RM, Swyt C, Fiori CE, Yanagihara R, Salazar AM, Gajdusek DC. Low-calcium, high-aluminium in amyotrophic lateral sclerosis of Guam. *Lancet* 1985;11:1353.
94. Mann DMA. Calcification of the basal ganglia in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1988;76:595-8.
95. Barceloux DG. Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999;37:173-94.
96. Stearns DM, Kennedy LJ, Courtney KD. Reduction of hexavalent chromium by ascorbate leads to chromium-DNA binding and strand breakage DNA *in vitro*. *Biochem* 1995;34:910-9.
97. Shi X, Datal NS. On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species. *Arch Biochem Biophys* 1990;277:342-50.
98. Bagchi D, Stohs JS, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG. Cytotoxicity and mechanism of different forms of chromium. *Toxicology* 2002;180:5-22.
99. El-Yazigi A, Martin CR, Siqueira EB. Concentration of chromium, cesium and tin in cerebrospinal fluid of patients with brain neoplasm, leukemia or other non-cerebral malignancies, and neurological disease. *Clin Chem* 1988;34:1084-6.

100. Aguilar MV, Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Meseguer I, Mateos-Vega CJ, Gonzalez-Muñoz MJ, De Bustos F, Gomez-Escalonilla C, Ortí-Pareja M, Zurdo M, Martínez-Para MC. Cerebrospinal fluid selenium and chromium levels in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1998;105:1245-51.
101. Gerlach M, Ben-Schacar D, Rieder P, Youdim MBH. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative disease? *J Neurochem* 1994;63:793-807.
102. Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagolapan S, Anderson JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1037-48.
103. Berg D, Gerlach M, Youdim MBH, Double KL, Zecca L, Riederer P, Becker G. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 2001;79:225-36.
104. Gibb W. Melanin, tyrosin hydroxylase, calbindin and substance P in the *substantia nigra* in relation to nigrostriatal projections and differential neuron susceptibility in Parkinson's disease. *Brain Res* 1992;593:346-8.
105. Hirsh EC, Gabriel A, Agid Y. Melanized dopamine neurons are differentially susceptible to degeneration in PD. *Nature* 1988;28:345-8.
106. Connor J, Menzies S, St. Martin SM, Mufson EJ. The cellular distribution of transferrin, ferritin and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res* 1990;27:595-611.
107. Zecca L, Gallorini M, Schunemann V. Iron, neuromelanin, and ferritin content in the *substantia nigra* of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J Neurochem* 2001;76:1766-73.
108. Jellinger K, Kienzl E, Rumpelmaier G, Paulus W, Riederer P, Stachelberger H, Youdim MB, Ben-Shachar D. Iron and ferritin in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1993;60:267-72.
109. Double KL, Gerlach M, Schunemann V. Iron binding characteristics of neuromelanin of the human *substantia nigra*. *Biochem Pharmacol* 2003;66:489-94.
110. Kroel ES, Lieber DC. Photoprotective actions of natural and synthetic melanins. *Chem Res Toxicol* 1998;9:1080-9.
111. Nau-Staud K, Nau WM, Haefliger IO, Flammer J. Lipid peroxidation in porcine irises: dependance on pigmentacion. *Curr Eye Res* 2001;22:229-34.
112. Gerlach M, Double KL, Youdim MBH, Riederer P. Strategies for the protection dopaminergic neurons against neurotoxicity. *Neurotox Res* 2000;2:99-114.
113. Double K, Riederer P, Gerlach M. The significance of neuromelanin in PD. *Drug News Develop* 1999;12:33-45.
114. Mochizuki H, Nishi K, Mizuno Y. Iron-melanin complex is toxic to dopaminergic neurons in nigrostriatal co-culture. *Neurodegeneration* 1993;2:1-7.
115. Romani A, Scarpa A. Regulation of cell magnesium. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:1-12.
116. Aretini P, Della Croce C, Bartoli C, Cini M, Bronzetti G. Il magnesio: microelemento essenziale per la vita. *Biologi Italiani* 1999;8:12-7.
117. Durlach J, Poenaru S, Roubani S. The control of central neural hyperexcitability in magnesium deficiency. In: Essmann WB (Ed.). *Nutrients and Brain Function*. Basel: Karger; 1987. p. 49-71.
118. Rayssiguier Y, Gueux E, Büssiere L. Dietary Mg affects susceptibility of lipoproteins and tissues to peridoxation in rats. *J Am Coll Nutr* 1993;12:133-7.
119. Yasui M, Strong MJ, Ota K, Verity MA. *Mineral and metal neurotoxicology*. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press; 1996.
120. Yasui M, Yano I, Yase Y, Ota K. Distribution of magnesium in the central nervous system tissue, trabecular and cortical bone in rats fed with unbalanced of minerals. *J Neurol Sci* 1990;99:177-83.

121. Yasui M, Kihira T, Ota K. Calcium, magnesium and aluminium concentrations in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 1992;13:593-600.
122. Lydén A, Larsson BS, Lindsquit NG. Melanin affinity of manganese. *Acta Pharmacol Toxicol* (Copenhagen)1984;55:133-8.
123. Donaldson J, McGregor D, LaBella F. Manganese neurotoxicity: a model for free radical mediated neurodegeneration? *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60:1398-405.
124. Witholt R, Gwiazda RH, Smith DR. The neurobehavioral effects of subchronic manganese exposure in the presence and absence of pre-parkinsonism. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22:851-61.
125. Verity MA. Manganese neurotoxicity: a mechanistic hypothesis. *Neurotoxicology* 1999;20:489-98.
126. Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Aguilar MV, Arrieta FJ, Jorge-Santamaria A, Cabrera-Valdivia F, Ayuso-Peralta L, Rabasa M, Vázquez A, Garcia E, Martinez-Para. Serum and urinary manganese levels in patients with Parkinson's disease *Acta Neurol Scand* 1995;91:317-20.
127. Yamada M, Olmo S, Okayasu I, Okeda R, Hatekeyama S, Watanabe H. Chronic manganese poisoning: a neuropathological study with determination of manganese distribution in the brain. *Acta Neuropathol* 1986;70:273-8.
128. Hertzman C, Wiens M, Bowering D, Snow B, Calne DB. Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. *Am J Ind Med* 1990;17:349-55.
129. Zatta P, Lucchini R, van Rensburg SJ, Taylor A. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res Bull* 2003;62:15-28.
130. Hussain S. Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. *J Environ Sci Health B* 1997;32(3):395-409.
131. Chavez E, Holgun CJ. Mitochondrial Calcium Release as induced by Hg^{2+} . *J Biol Chem* 1998;263:3582-87.
132. Shenker BJ. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes: Alteration in cellular glutathione content. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1993;15(2-3):273-90.
133. Uversky VN, Li J, Fink AL. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein. *J Biol Chem* 2001;276(47):44284-96.
134. Olson C-G, Hogsted C. Parkinson's disease and occupational exposure to organic solvents, agricultural chemicals and mercury – a case referent study. *Scan J Work Environ Health* 1981;7:252-6.
135. Ngim CH, Devathasan G. Epidemiologic study on the association between body burden mercury level and idiopathic Parkinson's disease. *Neuroepidemiology* 1989;8:128-141.
136. Lockitch G. Perspectives on lead toxicity. *Clin Biochem* 1993;26:371-81.
137. Orrenius S, Burkitt M, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 1992;32S:33-42.
138. Markovac J, Goldstein GW. Picomolar concentration of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* 1988;334:71-3.
139. Cheung WY. Calmodulin: its a potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity. *Fed Proc* 1984;43:2995-9.
140. Donaldson WE, Knowles SO. Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? *Comp Biochem Physiol C* 1993;104:377-9.
141. Shafiq-Ur-Rehman S. Lead-induced regional lipid peroxidation in brain. *Toxicol Lett* 1984;21:333-7.

142. Ali SF, Bondy SC. Triethyllead-induced peroxidation damage in various region of rat brain. *J Toxicol Environ Health* 1989;26:235-42.
143. Lasley SM. Regulation of dopaminergic activity, but not tyrosine hydroxylase, is diminished after chronic inorganic lead exposure. *Neurotoxicology* 1992;13:625-35.
144. Rotilio G, Carri MT, Rossi L, Ciriolo MR. Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. *Life* 2000;50:309-14.
145. Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 1996;63:797S-811S.
146. Beshgetoor D, Hambidge M. Clinical conditions altering copper metabolism in human. *Am J Clin Nutr* 1998;67:1017S-21S.
147. Loeffler DA, LeWitt PA, Jumeau PL, Sima AAF, Nguyen HU, De Maggio AJ, Brickman CM, Brewer GJ, Dick RD, Troyer MD, Kanaley L. Increased regional brain concentration of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders. *Brain Res* 1996;738:265-74.
148. Paik SR, Shin HJ, Lee JH, Chang CS, Kim J. Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein. *J Biochem* 1999;340:821-8.
149. White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Cappai R. Homocysteine potentiates copper and amyloid β peptide-mediated toxicity in primary neural cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem* 2001;76:1509-20.
150. Bremner I. Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr* 1998;67:1069S-73S.
151. Vallee BL, Falchuck KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 1993;73:79-118.
152. K  mel G, Schrader S, Zentgraf H, Brendel M. Zur Therapie banaler HSV-L  sionen: der molekulare Mechanismus der antiviralen Aktivit  t von Zinksulfat. *Hausarzt* 1991;42:439-45.
153. Prody CI, Holland NR. CNS demyelination from zinc toxicity? *Neurology* 2000;54:1705-6.
154. Connor JR, Menzies SL. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia* 1996;17:83-93.
155. Jenner P. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in PD. *Acta Neural Scand Suppl* 1993;146:6-13.
156. Barker JE, Heales SJR, Cassidy A, Bolanos JP, Land JM, Clarke JB. Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity, an enzyme susceptible to oxidative damage. *Brain Res* 1996;716:118-122.
157. Maret W. Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc. *Neurochem Int* 1995;10:111-7.
158. Sato M, Bremner I. Oxygen free radical and metallothionein. *Free Radical Biol Med* 1993;14:325-37.
159. Persechini A, McMillan K, Masters BBS. Inhibition of nitric oxide synthase activity by zinc ion. *Biochemistry* 1995;34:15091-5.
160. Ward E, Okun A, Ruder M, Fingerhut M, Steenland K. A mortality study of workers at seven beryllium processing plants. *Am J Ind Med* 1992;22:885-904.
161. Steenland K, Ward E. Lung cancer incidence among patients with beryllium disease: a cohort mortality study. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1380-5.
162. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997;388:482-8.

163. Jennette KW. The role of metal cancerogenesis: biochemistry and metabolism. *Environ Health Persp* 1981;40:233-52.
164. Bauer M, Alda M, Priller J, Young TL. Implication of the neuroprotective effects of lithium for the treatment of bipolar and neurodegenerative disorders. *Pharmacopsychiatry* 2003;36(3):S250-S4.
165. Stangl GI, Kirchgessner M. Nickel deficiency alters lipid liver metabolism in rats. *J Nutr* 1996;126:2466-73.
166. Birchall JD, Chappell JS. The chemistry of aluminium and silicon in relation to Alzheimer's disease. *Clin Chem* 1988;34:265-7.
167. McLachlan D. Aluminium and the risk for Alzheimer's disease. *Environmetrics* 1995;6:233-75.
168. Flaten TP. Geographical associations between aluminium in drinking water and death rates with dementia, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis in Norway. *Trace Elem Med* 1987;4:179-80.
169. Berman E. *Toxic metals and their analysis*. Philadelphia: Heyden & Son Ltd.; 1980.
170. Sasi MM, Haider SS, Fakhri M-El, Ghwarska KM. Microchromatographic analysis of lipids, protein and occurrence of lipid peroxidation in various brain areas of vanadium exposed rats: A possible mechanism of vanadium neurotoxicity. *Neurotoxicity* 1994;15:413-20.
171. Daniel SE, Lees AJ. Parkinson's disease society brain bank, London: overview and research. *J Neural Transm* 1993;39:165-72.
172. Fahn S, Elton RL. Unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne D, Goldstein M (Ed.). *Recent developments in Parkinson's disease*. Florham Park, NJ: MacMillan Healthcare Information, 1987. p. 153-63 e 293-304.
173. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967;17:427-42.
174. Kikkawa S. Comparative study of hair trace elements and drugs in 7 case of Parkinson's disease and 5 case of other disease. *J Pract Pharm (Yakkyoku)* 1994;45:801-5.
175. Pamphlett R, McQuilty R, Zarkos K. Blood levels of toxic and essential metals in motor neuron disease. *Neurotoxicology* 2001;22:401-10.
176. Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Aguilar MV, Meseguer I, Mateos-Vega CJ, González-Muñoz MJ, de Bustos F, Martínez-Salio A, Ortí-Pareja M, Zurdo M, Martínez-Para MC. Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1998;105:497-505.
177. Gazzaniga GC, Ferraro B, Camerlengo M, Casto L, Viscardi M, Mamoli A. A case control study of CSF copper, iron and manganese in Parkinson's disease. *Ital J Neurol Sci* 1992;13:239-43.
178. Jiménez-Jiménez FJ, Fernández-Calle P, Martínez-Vanaclocha M, Herrero E, Molina JA, Vázquez A, Codoceo R. Serum levels of zinc and copper in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1992;112:30-3.
179. Tórsdóttir G, Kristinsson J, Sveinbjörnsdóttir S, Snaedal J, Jóhannesson T. Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease. *Pharmacol Toxicol* 1999;85:239-43.
180. Pall HS, William AC, Blake DR, Lunec J, Gutteridge JM, Hall M, Taylor A. Raised cerebrospinal fluid copper concentration in Parkinson's disease. *Lancet* 1987;2:238-41.
181. Hegde LM, Shanmugavelu P, Vengamma B, Sathyanarayana Rao TS, Menon RB, Rao RV, Jagannatha Rao KS. Serum trace element levels and the complexity of inter-element relations in patients with Parkinson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 2004;18:163-71.

182. Kocatürk PA, Akbostanaci MC, Tan F, Kavas GÖ. Superoxide dismutase activity and zinc and copper concentrations in Parkinson's disease. *Pathophysiology* 2000;7:63-7.
183. Boll MC, Sotelo J, Otero E, Alcaraz-Zubeldia M, Rios C. Reduced ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1999;265:155-8.
184. Cabrera-Valdivia F, Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Fernández-Calle P, Vázquez A, Cañizares-Liébaña F, Larumbe-Lobalde S, Ayuso-Peralta L, Rabasa M, Codoceo R. Peripheral iron metabolism in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1994;125:82-86.
185. Glick JL. Use of magnesium in the management of dementias. *Med Sci Res* 1990;18:831-3.
186. Lucchini R, Albini E, Cortesi I, Placidi D, Bergamaschi E, Traversa F, Alessio L. Assessment of neurobehavioral performance as function of current and cumulative occupational lead exposure. *Neurotoxicology* 2000;21:805-12.
187. Coffey CE, Ross DR, Ferren EL, Sullivan JL, Olanow CW. Treatment of the "on-off" phenomenon in parkinsonism with lithium carbonate. *Ann Neurol* 1982;12:375-9.
188. Haider SS, Abdel-Gayoum AA, El-Fakhri M, Ghwarsha KM. Effect of selenium on vanadium toxicity in different regions of rat brain. *Hum Exp Toxicol* 1998;17:23-8.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, settembre 2005 (n. 3) 11° Suppl.