

ISSN 0017-0305



Organo ufficiale
della Società Italiana
di Gerontologia e Geriatria



GIORNALE DI GERONTOLOGIA

Ipertensione resistente nell'anziano

Terapia antitrombotica domiciliare nel paziente geriatrico
con fibrillazione atriale

Effetto degli estratti di papaya fermentata sullo stress ossidativo
in pazienti con Malattia di Alzheimer

PASSI d'Argento

Occlusione intestinale nell'anziano

Emofilia A acquisita

La fibrillazione atriale nel paziente geriatrico

Agosto 2013

Volume LXI

Numero 4

GIORNALE DI GERONTOLOGIA, LXI/4, 183-240, 2013

*Indexed in Embase, Excerpta Medica Database
and Scopus Elsevier Database*

Periodico bimestrale - POSTE ITALIANE SPA - Spedizione in Abbonamento Postale
D.L. 353/2003 conv.in L.27/02/2004 n°46 art.1, comma 1, DCB PISA - Taxe perçue - Tassa riscossa - Pisa (Italy)
Aut. Trib. di Firenze n. 705 del 29 gennaio 1953

PACINI
EDITORE
MEDICINA

ARTICOLO ORIGINALE
ORIGINAL ARTICLE

Sezione di Geriatria Clinica

Effetto degli estratti di papaya fermentata sullo stress ossidativo in pazienti con Malattia di Alzheimer

Effects of fermented papaya powder on oxidative stress in Alzheimer Disease

M. BARBAGALLO, M. BELVEDERE, A. DI PRIMA, S. MIRAGLIA, L.J. DOMINGUEZ

Cattedra di Geriatria, UOC di Geriatria e Lungodegenza, Università degli Studi di Palermo

Brain tissue is particularly susceptible to oxidative damage, which has been associated with pathological findings of Alzheimer's disease (AD), such as amyloid plaques and protein fibrils. Oxidative stress alterations, including increased production of reactive oxygen metabolites, decline of antioxidant systems, and decreased efficiency in repairing molecules, have been linked to the development of AD. Postmortem studies on brain tissue from AD patients have shown several oxidative damage markers, such as increased lipid peroxidation, oxidative damage of proteins, glyco-oxidation, and reduction of antioxidant systems.

We studied 40 patients referred to our Geriatric Unit (age $78,2 \pm 1,1$ years), 28 patients with AD and 12 age-matched controls. All patients were tested with measurements of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in the urine to assess oxidative stress. Twenty AD patients (group 1) were supplemented with fermented papaya powder (FPP, Immun'Age, 4.5 grams twice a day) for 6 months, while other 8 AD patients (group 2) did not receive any treatment. At baseline, 8-OHdG was significantly higher in patients with AD vs. controls ($13,7 \pm 1,61$ ng/ml vs. $1,6 \pm 0,12$ ng/ml, $p < 0,01$). In group 1, after supplementation with FPP, 8-OHdG was significantly reduced (from $14,1 \pm 1,7$ ng/ml to $8,45 \pm 1,1$ ng/ml, $p < 0,01$), while in group 2 (AD patients, not supplemented) 8-OHdG did not change, with a non significant tendency to increase (from $12,5 \pm 1,9$ ng/ml to $19,6 \pm 4,1$ ng/ml, $p = NS$). Our data show that: 1) AD is associated with increased oxidative stress, and 2) that antioxidant FPP may be helpful to counteract excessive production of free radicals in these patients.

Key words: Oxidative stress, ROS, Alzheimer's disease, Aging, Papaya, Immunage, Cognitive decline

INTRODUZIONE

Il cervello è un organo particolarmente suscettibile ai danni da stress ossidativo. Il metabolismo del tessuto cerebrale necessita di elevate livelli di energia. È molto ricco di acidi grassi polinsaturi, facilmente ossidabili, e di metalli di transizione che facilitano la formazione di radicali liberi dell'ossigeno. Il cervello è inoltre caratterizzato infine da un basso contenuto di sistemi antiossidanti¹.

La Malattia di Alzheimer (AD) è caratterizzata anatomopatologicamente dalla presenza di depositi extracellulari di beta-amiloide, da aggregati intracellulari di proteina tau iperfosforilata e da grovigli neurofibrillari. Tali alterazioni caratteristiche sono accompagnate da modificazioni mitocondriali e delle sinapsi neuronali. Numerosi mutamenti del metabolismo ossidativo quali un'aumentata produzione di metaboliti reattivi dell'ossigeno, e/o una riduzione di efficienza dei sistemi antiossidanti e della capacità riparativa

■ Arrivato in Redazione il 22/7/2013. Accettato il 30/7/2013.

■ Mario Barbagallo, UOC di Geriatria e Lungodegenza, AOUP Azienda Universitaria Policlinico, via del Vespro 129, 90127 Palermo - Tel. +39 091 6552885 - Fax +39 091 6552952 - E-mail: mario.barbagallo@unipa.it

delle molecole danneggiate sono presenti nell'AD e sono state collegate alla sua insorgenza. I danni da stress ossidativo sono uno degli eventi fisiopatologici precoci nello sviluppo dell'AD e sembrano anche precedere la formazione delle placche amiloidi e dei grovigli neurofibrillari. I radicali liberi dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species - ROS) possono causare una serie di danni al DNA e al RNA cellulari, originando perossidazione delle membrane e danno neuronale. Le alterazioni del metabolismo ossidativo potrebbero rendere il cervello più suscettibile al danno da beta-amiloide, che a sua volta ha una azione pro-ossidante². Studi autoptici su tessuto cerebrale di pazienti con AD hanno confermato la presenza di numerosi segni di stress ossidativo quali un aumento della perossidazione lipidica, della ossidazione delle proteine, e dei glicidi, ed una riduzione dei sistemi enzimatici antiossidanti³⁻⁵. Studi in vitro hanno evidenziato come le proprietà neurotossiche della beta-amiloide possano essere mediate dai radicali liberi dell'ossigeno. I depositi di amiloide si associano ad un'aumentata espressione dei markers di stress ossidativo, ad anomalie strutturali dei mitocondri e a danni del DNA mitocondriale⁶. Poiché l'accumulo di beta-amiloide può a sua volta causare un'ulteriore produzione di ROS, non è chiaro se l'eccesso di stress ossidativo sia un evento primario o secondario nell'AD. Tuttavia, questo aspetto appare di importanza relativa, in quanto la produzione di ROS, anche se fosse secondaria, a sua volta è dannosa per il tessuto cerebrale e può ulteriormente contribuire al danno neuronale, suggerendo che ogni sforzo volto alla rimozione e/o alla prevenzione della formazione dei ROS possa essere utile nei malati di AD.

La papaya (*Carica papaya L.*) ha dimostrato di esercitare numerose azioni protettive per le sue potenti proprietà antiossidanti naturali: inibisce la perossidazione lipidica⁷, favorisce l'aumento di attività enzimatiche antiossidanti quali la glutazione S-transferasi negli epatociti⁸, protegge il DNA e le proteine dai ROS ed ha mostrato di proteggere il tessuto cerebrale dai danni ossidativi⁷⁻⁹. A livello neuronale, la papaya ha dimostrato di avere una azione neuroprotettiva e di migliorare lo stato ossidativo in cellule neuronali umane, e di proteggere dagli insulti da stress ossidativo collegati ad esempio alla citotossicità da alluminio in cellule neuronali¹⁰. Una preparazione di papaya fermentata (FPP) prodotta mediante fermentazione del

frutto di papaya con dei miceti, ha dimostrato di proteggere le cellule in vitro sia dalla deposizione di beta-amiloide che dai danni ossidativi ad essa collegati. Il trattamento con FPP ha inoltre aumentato la sopravvivenza delle cellule neuronali, prevenendone l'apoptosi, la riduzione del calcio intracellulare, e la produzione e l'accumulo nelle cellule di ROS, quali radicali idrossilici liberi, anione superossido ed ossido nitrico¹¹. A livello clinico la somministrazione orale di papaya in topi ha attenuato la riduzione della memoria a breve e lungo termine indotta dalla scopolamina¹².

Obiettivo del presente studio è stato: a) quello di misurare lo stress ossidativo in pazienti con AD iniziale di grado lieve in confronto a pazienti di controllo di pari età senza AD utilizzando un test immunoenzimatico per la misurazione della 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) nelle urine; e b) di valutare il possibile ruolo antiossidante di una preparazione di papaya fermentata nel contrastare la eccessiva produzione di radicali liberi nei pazienti con AD.

PAZIENTI E METODI

Sono stati studiati 40 pazienti (23 donne e 17 uomini, età media: $78,2 \pm 1,1$ anni) valutati presso l'Unità Valutativa Alzheimer (UVA n. 6) della UOC di Geriatria e Lungodegenza del Policlinico Universitario (AOUP) di Palermo; 28 pazienti avevano avuto diagnosticato un AD iniziale di grado lieve in base ai criteri del DSM-IV e NINCDS-ADRDA, mentre gli altri 12 erano pazienti di controllo della stessa età (Tab. I).

Durante la durata dello studio i pazienti non erano in trattamento con altri farmaci neurotrofici. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a misurazione dello stress ossidativo, mediante test immunoenzimatico per la misurazione della 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) nelle urine¹³. Per dosare l'8-OHdG è stato validato un test ELISA, che mediante l'uso di una curva di taratura, permette di standardizzare in maniera quantitativa la concentrazione di 8-OHdG. I risultati del test sono stati considerati nella norma per valori di 8-OHdG compresi tra 0-10 ng/ml.

I 28 pazienti selezionati con AD sono stati suddivisi in due gruppi: I pazienti del gruppo 1 (venti pazienti) sono stati trattati per 6 mesi con un supplemento di una preparazione di

Tab. I. Caratteristiche cliniche dei pazienti.

	AD (group 1) Baseline pre-supplementazione	AD (group 2) non supplementati	Controlli	p
Età (anni)	78,1±1,1	78,3±1,0	77,9±1,2	NS
8-OHdG (ng/ml)	14,1±1,7	12,5±1,9	1,6±0,12	<0,001
SBP (mmHg)	132,9±1,9	130,7±2,1	131,0 ±2,3	NS
DBP (mmHg)	78,6±1,1	77,7±1,2	77,9±1,2	NS
CHOL (mg/dl)	207,9±39	205,8±38	195,7±41	NS
TG (mg/dl)	127,5±47	118±57	112±49	NS
HDL (mg/dl)	43,8±12	47,9±14	47,6±13	NS
LDL (mg/dL)	136,8±35	128,9±40	127,7±41	NS
BMI (Kg/m ²)	24,9±5,5	24,8±6,4	24,1±6,1	NS
MMSE	22,1±1,5	21,9±1,4	28,8±2,1	P<0.01

papaya fermentata (FPP, noto commercialmente come Immun'Age, preparato fermentando la C. Papaya L. all'Osato Research Institute, Gifu, Japan) alla dose di 9 grammi (4,5 grammi due volte al giorno per via orale). I soggetti del gruppo 2 (8 pazienti con AD) non hanno ricevuto alcun trattamento.

RISULTATI

Le caratteristiche cliniche dei soggetti studiati sono presentate in Tabella I.

In condizioni di base, l'8-OHdG era significativamente più alta nei pazienti con AD vs. i controlli ($13,7 \pm 1,61$ ng/ml vs. $1,6 \pm 0,12$ ng/ml, $p < 0,01$, Fig. 1).

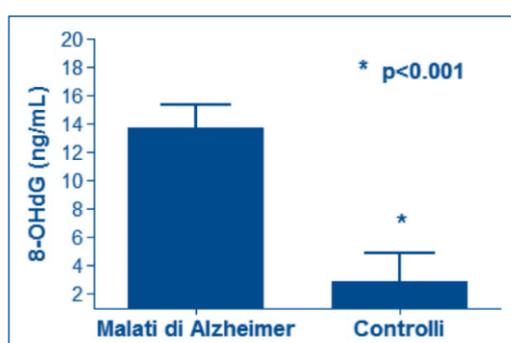


Fig. 1. Livelli di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) nei pazienti con Malattia di Alzheimer e nei controlli

Nel gruppo 1, l'8-OHdG è risultato essere significativamente ridotto dopo la supplementazione con FPP (da $14,1 \pm 1,7$ ng/ml a $8,45 \pm 1,1$ ng/ml, $p < 0,01$, Fig. 2, panel A), mentre nel gruppo 2, non supplementato, l'8-OHdG non

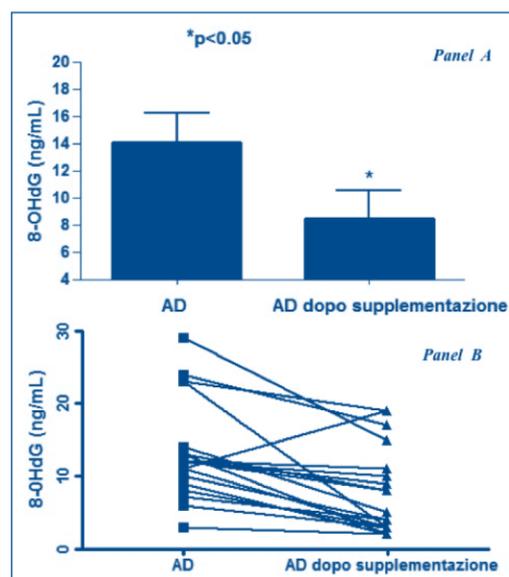


Fig. 2.

Panel A. Livelli di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) nei pazienti con Malattia di Alzheimer (AD) prima e dopo la supplementazione con FPP

Panel B. Valori di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) in ciascuno dei 20 pazienti con Malattia di Alzheimer (AD) prima e dopo la supplementazione con FPP

si è modificato significativamente, mostrando una non significativa tendenza ad un aumento (da $12,5 \pm 1,9$ ng/ml a $19,6 \pm 4,1$ ng/ml, $p=NS$). Nei 20 pazienti trattati con FPP, lo stress ossidativo misurato mediante 8-OHdG si è ridotto in tutti tranne che in un paziente (figura 2, panel B).

Non sono state evidenziate significative modificazioni nel MMSE e sui parametri di laboratorio esaminati.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I meccanismi molecolari e fisiopatologici che stanno alla base dei danni neurodistrofici dell'AD hanno ancora molti lati oscuri. Alcuni dati sperimentali attribuiscono ai ROS ed al conseguente danno ossidativo un ruolo nell'invecchiamento e nel determinismo del danno neurodistrofico dell'AD. Il processo di invecchiamento si associa ad un aumento dello stress ossidativo¹⁴. L'alterazione del metabolismo ossidativo presente nell'età avanzata potrebbe rendere il cervello più suscettibile al danno da peptidi neurotossici quali i depositi di beta-amiloide. Nei pazienti con AD è stata anche suggerita una alterazione della risposta immuno-infiammatoria, e della produzione di citochine¹⁵. Da un punto di vista fisiopatologico l'aumento di stress ossidativo associato all'età può essere ricondotto sia ad un aumento della produzione di metaboliti reattivi dell'ossigeno, che da un declino dei sistemi antiossidanti di difesa e o da una diminuita efficienza nella riparazione delle molecole danneggiate. Il tessuto cerebrale presenta un minore contenuto di sistemi antiossidanti rispetto ad altri tessuti ed organi ed è quindi particolarmente suscettibile al danno ossidativo. Inoltre, le alterazioni del metabolismo ossidativo presenti nell'età avanzata potrebbero rendere il tessuto cerebrale più suscettibile al danno causato dall'accumulo di peptidi neurotossici quali la proteina beta-amiloide¹⁶.

I radicali liberi sono specie estremamente reattive, che una volta formati possono iniziare una serie di reazioni nocive per la cellula. I principali danni avvengono per integrazione con macromolecole fondamentali alla sopravvivenza cellulare, quali DNA, proteine ed acidi grassi polinsaturi (che costituiscono la membrana cellulare, di cui è molto ricco il tessuto cerebrale). È importante sottolineare come, anche in condizioni fisiologiche, vi è una produzione di radicali liberi

che di norma è controbilanciato da sistemi cellulari di natura enzimatica e da antiossidanti di origine endogena. Il danno causato dai radicali liberi assume grande importanza quando si crea uno squilibrio tra produzione degli stessi ed i sistemi deputati alla loro neutralizzazione. Diversi studi hanno dimostrato come, con l'invecchiamento, ci sia una riduzione dell'attività dei mitocondri associata ad un aumento del danno del DNA mitocondriale. A livello cerebrale numerosi studi *in vitro* evidenziano come le proprietà neurotossiche della beta-amiloide possano essere mediate da alcune specie radicaliche dell'ossigeno^{16,17}. La proteina beta-amiloide causa ossidazione di componenti essenziali alla corretta funzionalità cellulare come le membrane, le pompe ioniche, i mitocondri e il DNA nucleare, causandone la apoptosi¹⁸. Un utile parametro per la valutazione del danno ossidativo del DNA mitocondriale a livello cerebrale è rappresentata dalla misurazione dell'8-OH-2DG, forma ossidata della deossiguanosina¹⁹.

È stato proposto che sostanze dotate di proprietà antiossidanti o in grado di potenziare i sistemi endogeni di difesa dai radicali liberi potrebbero prevenire l'insorgenza o bloccare l'evoluzione di AD²⁰. In passato, studi di intervento randomizzati e controllati nella AD, con antiossidanti quali seligilina e vitamina E, hanno prodotto risultati modesti ma significativi²¹.

La papaya fermentata (FPP) (un prodotto della fermentazione con miceti della *Carica Papaya Linn*) è un supplemento nutraceutico. Studi precedenti hanno evidenziato che la FPP ha un effetto favorevole sui parametri immunologici, ematologici, infiammatori e sui parametri di stress ossidativo in numerose malattie croniche e/o degenerative (talassemia, cirrosi, diabete)²². *In vitro* è stato suggerito un potenziale effetto neuroprotettivo in un modello cellulare di AD, mostrando che FPP ha significativamente contrastato la neurotossicità da beta-amiloide^{11 20}. FPP ha anche ridotto l'apoptosi legata alla attivazione dello stress ossidativo e delle citochine infiammatorie^{11 18} ed ha contrastato i danni del DNA e la produzione di radicali liberi indotta da numerose sostanze pro-ossidanti, inclusi ioni ferro, rame, benzopirene, metilguanidina, alluminio ecc.^{7-12 22-24}.

Poiché i danni da radicali liberi sono stati implicati nel processo di invecchiamento ed in numerose patologie croniche e neurodegenerative ad esso collegate, è stato ipotizzato un ruolo dell'azione antiossidante della FPP nel contra-

stare lo stress ossidativo associato a queste condizioni²². Un utile parametro per la valutazione dell'aumento di danno ossidativo al DNA mitocondriale è rappresentato dalla misura della 8-idrossi-2-deossiguanosina, forma ossidata della deossiguanosina. Con l'invecchiamento aumenta il contenuto di questa base nucleotidica modificata nel DNA mitocondriale estratto da tessuto cerebrale umano¹⁹.

I risultati del presente studio mostrano che 1) AD si associa ad un aumento dello stress ossidativo, e che 2) FPP può essere utile nell'aiutare a contrastare la eccessiva produzione di radicali liberi presente nei pazienti con AD. Lo studio è stato mirato specificamente a studiare la azione di FPP sullo stress ossidativo, è stato eseguito in pazienti con AD iniziale e di forma lieve, e che ha avuto una durata breve (6 mesi). Studi successivi di maggiore durata e con un numero

maggiore di soggetti sarebbero utili per valutare le potenziali azioni cliniche di FPP e la possibile rilevanza della riduzione dello stress ossidativo sulla storia naturale della malattia.

I precedenti studi in vitro sono promettenti e la azione preventiva dimostrata sui danni da beta-amiloide¹¹ suggeriscono che sarebbe altresì utile valutare la azione di FPP in stadi più avanzati della malattia ed in combinazione con farmaci neurotrofici. Sarebbe altresì interessante identificare la componente di FPP ad azione neurotrofica. I dati presentati qui sono utili ed importanti per la consistenza e significatività della riduzione dello stress ossidativo nei soggetti studiati (Fig. 2), e conferma la possibilità di individuare nuove strategie terapeutiche utili a controbilanciare la produzione eccessiva di radicali liberi ed a riequilibrare il network ossido-riduttivo nei soggetti con AD.

Il tessuto cerebrale è particolarmente suscettibile ai danni da stress ossidativo. Un'aumentata produzione di metaboliti reattivi dell'ossigeno ed una riduzione di efficienza dei sistemi antiossidanti sono state collegate alla Malattia di Alzheimer (AD). Alterazioni neuropatologiche connesse all'AD, quali placche amiloidi e degenerazione neurofibrillare sono state associate allo stress ossidativo e studi autoptici su tessuto cerebrale di pazienti con AD hanno mostrato segni di stress ossidativo quali un aumento della perossidazione lipidica, ossidazione di proteine, glucossidazione e riduzione nei sistemi antiossidanti. Abbiamo studiato 40 pazienti (età media:78,2±1,1 anni), 28 pazienti con AD, e 12 controlli di pari età. In tutti i soggetti è stato valutato lo stress ossidativo, mediante misurazione della 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) nelle urine. Dei 28 pazienti con AD, 20 (gruppo 1) sono stati trattati per 6 mesi con un supplemento di polvere di papaya fermentata (FPP, Immun'Age, 4,5 grammi due volte al giornoevuto alcun trattamento. In condizioni di base, l'8-OHdG era significativamente più alta nei pazienti con AD vs. i controlli (13,7±1,61 ng/ml vs. 1,6±0,12 ng/ml, p<0,01). Nel gruppo 1 trattato con FPP, dopo la supplementazione, l'8-OHdG si è significativamente ridotta (da 14,1 ± 1,7 ng/ml a 8,45 ± 1,1 ng/ml, p < 0,01), mentre nel gruppo 2, non supplementato, l'8-OHdG non si è modificata significativamente, con una tendenza all'aumento (da 12,5 ± 1,9 ng/ml a 19,6 ± 4,1 ng/ml, p = NS). I nostri dati mostrano che: 1) l'AD si associa ad un aumento dello stress ossidativo, e che 2) il FPP può essere utile nell'aiutare a contrastare la eccessiva produzione di radicali liberi presente nei pazienti con AD.

Parole chiave: Stress ossidativo, ROS, Malattia di Alzheimer, Invecchiamento, Papaya, Immune, Declino cognitivo

BIBLIOGRAFIA

- Floyd RA. *Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders*. Proc Soc Exp Biol Med 1999;222:236-45.
- Jimenez Del Rio M, Velez-Pardo C. *The bad, the good, and the ugly about oxidative stress*. Oxid Med Cell Longev 2012;2012:163913.
- Coppede F, Migliore L. *DNA damage and repair in Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res 2009;6:36-47.
- Mao P, Reddy PH. *Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's Disease: Implications for early intervention and therapeutics*. Biochim Biophys Acta 2011;1812:1359-70.
- Mutysia EM, Bowling AC, Beal MF. *Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease*. J Neurochem 1994;63:2179-84.
- Aliyev A, Chen SG, Seyidova D, et al. *Mitochondria DNA deletions in atherosclerotic hypoperfused brain microvessels as a primary target for the development of Alzheimer's disease*. J Neurol Sci 2005;229:285-92.
- Imao K, Wang H, Komatsu M, Hiramatsu M. *Free radical scavenging activity of fermented papaya preparation and its effect on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in iron-induced epileptic foci of rats*. Biochem Molec Biol Int 1998;45:11-23.
- Nakamura Y, Morimitsu Y, Uzu T, et al. *Glutathione S-transferase inducer from papaya: rapid screening, identification and structure-activity relationship of isothiocyanates*. Cancer Lett 2000;157:193-200.

- ⁹ Rimbach G, Guo Q, Akiyama T, et al. *Ferric nitrilotriacetate induced DNA and protein damage: inhibitory effect of a fermented papaya preparation*. *Anticancer Res* 2000;20:2907-14.
- ¹⁰ Waly MI, Guizani N, Ali A, Rahman MS. *Papaya epicarp extract protects against aluminum-induced neurotoxicity*. *Exp Biol Med* 2012;237:1018-22.
- ¹¹ Zhang J, Mori A, Chen Q, Zhao BL. *Fermented papaya preparation attenuates β -amyloid precursor protein: β -amyloid-mediated copper neurotoxicity in β -amyloid precursor protein and in β -amyloid precursor Swedish mutation overexpressing SH-SY5Y cells*. *Neuroscience* 2006;143:63-72.
- ¹² Imao K, Kaneyama T, Ukai M. *PS-501 fermented papaya preparation improves scopolamine induced amnesia in mice*. *Res Commun Pharmacol Toxicol* 2001;6:197-204.
- ¹³ Kikuchi Y, Yasuhara T, Agari T, et al. *Urinary 8-OHdG elevations in a partial lesion rat model of Parkinson disease correlate with behavioral symptoms and nigrostriatal dopaminergic depletion*. *J Cell Physiol* 2011;226:1390-8.
- ¹⁴ Dominguez LJ, Galioto A, Pineo A, et al. *Age, homocysteine and oxidative stress: relation to hypertension and type 2 diabetes mellitus*. *J Am Coll Nutr* 2010;29:1-6.
- ¹⁵ Pellicanò M, Bulati M, Buffa S, et al. *Systemic immune responses in Alzheimer's disease: in vitro mononuclear cell activation and cytokine production*. *J Alzheimer's Dis* 2010;21:181-92.
- ¹⁶ Axelsen PH, Komatsu H, Murray IVJ. *Oxidative Stress and Cell Membranes in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease*. *Physiology* 2011;26:54-69.
- ¹⁷ Behl C, Davis JB, Lesley R, et al. *Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity*. *Cell* 1994;77:817-27.
- ¹⁸ Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL. *Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1470-4.
- ¹⁹ Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, et al. *Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain*. *Ann Neurol* 1993;34:609-16.
- ²⁰ Mayeux R, Sano M. *Drug therapy: treatment of Alzheimer's disease*. *N Engl J Med* 1999;341:1670-9.
- ²¹ Sano M, Ernesto C, Thomas RG, et al. *A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease*. *N Engl J Med* 1997;336:1216-22.
- ²² Aruoma OI, Hayashi Y, Marotta F, et al. *Applications and bioefficacy of the functional food supplement fermented papaya preparation*. *Toxicology* 2010;278:6-16.
- ²³ Noda Y, Murakami S, Mankura M, et al. *Inhibitory effect of fermented papaya preparation on hydroxyl radical generation from methylguanidine*. *J Clin Biochem Nutr* 2008;43:185-90.
- ²⁴ Nakamura Y, Yoshimoto M, Murata Y, et al. *Papaya seed represents a rich source of biologically active isothiocyanate*. *J Agric Food Chem* 2007;55:4407-13.