

REVIEW

ICTUS ISCHEMICO E MORTALITÀ NELL'ANZIANO: RUOLO DELLA RIDUZIONE ETÀ-CORRELATA DEL PRECONDIZIONAMENTO ISCHEMICO CEREBRALE

Ischemic stroke and mortality in the elderly: role of age-related reduction of cerebral ischemic preconditioning

DAVID DELLA-MORTE^{1,2}, MICHELE SCHIAVONE³, MARIA TERESA DEL GENIO³,
FRANCESCO CURCIO³, RAFFAELE PALMIROTTA², FIORELLA GUADAGNI²,
PASQUALE ABETE³

¹Department of Neurology, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL, USA;

²Department of Advanced Biotechnologies and Bioimaging, IRCCS San Raffaele, Rome;

³Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Naples

SUMMARY

Stroke is a leading cause of death in industrialized countries in subjects older than 65 years. The reasons are still unclear, but it has been proposed a reduction in endogenous mechanisms of defense against ischemic insults. The mechanism of cerebral ischemic preconditioning is characterized by a brief episode of ischemia that makes the brain more resistant against subsequent ischemic events prolonged: this "ischemic tolerance" has been demonstrated in numerous experimental models of cerebral ischemia and in some clinical studies. However, both experimental and clinical studies have shown an age-related impairment of the mechanisms of cerebral ischemic preconditioning, possibly due to alterations in the release of mediators and/or intracellular pathways. A powerful new tool for the treatment of ischemic stroke in the elderly may therefore be represented by agents able to mimic the effect of "cerebral" ischemic preconditioning, a mechanism that seems to be lost with aging.

Keywords: *Ischemic preconditioning, stroke, transient ischemic attack, mortality, elderly.*

L'ictus ischemico rappresenta una delle cause di morte più frequenti in pazienti di età >65 anni (1-3).

Indirizzo per la corrispondenza

Pasquale Abete, MD, PhD
Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali
Università degli Studi di Napoli "Federico II"
E-mail: p.abete@unina.it

Le ragioni dell'elevata mortalità per ictus e infarto miocardico nei pazienti anziani non sono chiare, nonostante sembrano chiamati in causa diversi fattori (per es. fattori di rischio come ipertensione, dislipidemia e diabete, alterazioni del sistema emocoagulativo in senso pro-trombotico, minore aggressività in alcune terapie com-

presa quella trombolitica, presenza di comorbilità) (4). La maggiore mortalità per ictus ischemico potrebbe pertanto essere dovuta, almeno in parte, alla riduzione età-correlata di un potente meccanismo endogeno di protezione nei confronti dell'ischemia. L'invecchiamento può essere, infatti, definito come un progressivo, inevitabile ed irreversibile declino funzionale con aumento della vulnerabilità (5).

È quindi verosimile che l'efficacia dei meccanismi endogeni di protezione nei confronti della patologia ischemica possa diminuire con l'invecchiamento (6).

Precondizionamento ischemico

Il precondizionamento ischemico (PI) è definito come il ripetersi di brevi episodi ischemici seguiti da un lungo periodo di ischemia, e rappresenta il più potente meccanismo endogeno di difesa nei confronti del danno da ischemia (7). Numerosi studi su animali e uomo hanno chiaramente dimostrato la capacità del PI nel proteggere gli organi, cervello compreso, dal danno ischemico (8, 9).

Inoltre, il PI può essere classificato in "precoce" quando l'effetto protettivo si verifica immediatamente, ossia durante le prime 1-3 ore dall'episodio ischemico ("prima finestra"), e in "ritardato", quando l'effetto protettivo compare nel giro di 24-72 ore dall'episodio ischemico ("seconda finestra") (10, 11). Recentemente sono state identificate altre forme di PI, ossia il cosiddetto "precondizionamento remoto", in cui l'ischemia in una regione di un organo garantisce la protezione in una regione "remota" dello stesso o di un altro organo (12) ed il "post-condizionamento", in cui brevi episodi di occlusione e riperfusione, al momento della riperfusione che segue un insulto ischemico sostenuto, conferi-

scono protezione dell'organo nei confronti del danno da ischemia-riperfusione (IR) (13). In questa rassegna sarà discusso esclusivamente il precondizionamento ischemico.

Il PI è stato ampiamente studiato in cardiologia clinica: angina pre-infartuale, fenomeno del warm-up e angioplastica coronarica transluminale sono considerati equivalenti clinici di PI (10, 11). È stato dimostrato che in pazienti con angina pre-infartuale si riduce l'incidenza di shock cardiogeno e la mortalità (10). Inoltre i pazienti con angina pre-infartuale trattati con terapia trombolitica hanno mostrato una più rapida riperfusione ed una riduzione dell'estensione dell'infarto (10). Equivalenti clinici di PI includono inoltre:

- a) il meccanismo di angina da sforzo dopo esercizio fisico che paradossalmente scompare col protrarsi dell'esercizio ("walk-through angina");
- b) la riduzione delle modificazioni cliniche ed elettrocardiografiche dell'ischemia da sforzo successive al primo test da sforzo ("Warm-up phenomenon");
- c) l'angioplastica coronarica transluminale in cui i segni elettrocardiografici, biochimici e clinici di ischemia si riducono dopo l'applicazione del primo palloncino (10, 11).

Precondizionamento ischemico: meccanismo

Nell'ischemia acuta, in seguito alla stimolazione dei recettori accoppiati alla proteina G (GPCR) da parte di mediatori quali adenosina, noradrenalina, bradichinina, oppioidi etc., viene attivata la fosfoinositide-3-chinasi (PI3K)/serina/treonina chinasi (Akt) con conseguente attivazione della ossido nitrico sintasi (NOS), produzione di ossido nitrico (NO) e attivazione

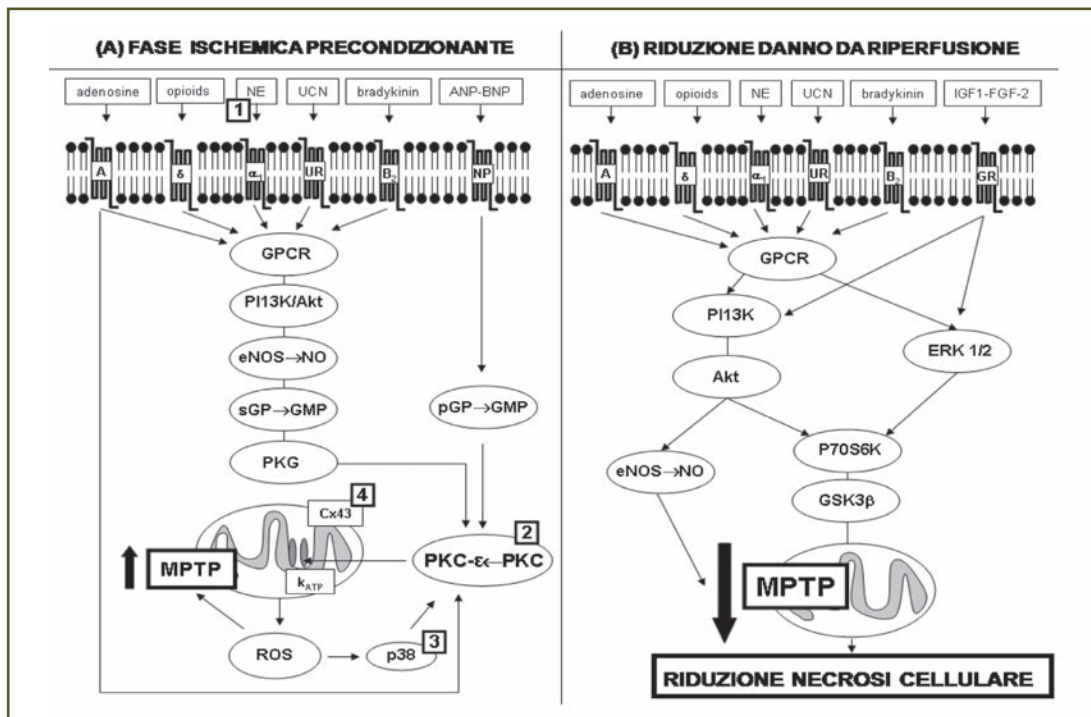


Figura 1 - Meccanismo di protezione cellulare indotto dal preconditionamento ischemico.

(A) Fase ischemica preconditionante: NE=Norepinefrine; UCN=Urocortins; ANP=Atrial Natriuretic Factor; BNP=Brain Natriuretic Factor; GPCR=G-protein coupled receptor; NPR, natriuretic peptide receptor; PI3K=Phosphatidylinositol 3 kinase; Akt=serine/threonine kinase; serine/threonine kinase eNOS=endothelial Nitric Oxide Synthase; NO=Nitric Oxide; sGC=soluble Guanylate Cyclase; GMP=Guanosine MonoPhosphate; pGC=particulate Guanylate Cyclase; PKG=Protein Kinase G; PKC=Protein Kinase C; Cx43=Connexin 43; KATP=Mitochondrial potassium ATP-dependent channels; ROS=Reactive Oxygen Species; MPTP=Mitochondrial Permeability Transition Pore; p38=p38 mitogen-activated protein kinase.

(B) Riduzione danno da riperfusione (RISK): IGF-1, insulin-like growth factor; FGF-2, fibroblast growth factor 2; GFR=Growth Factor Receptor; ERK=extracellular regulated kinase; P70S6K=p70 ribosomal S6 protein kinase; GSK3β=glycogen synthase kinase 3beta.

In (A) i numeri nei quadrati indicano le fasi del meccanismo compromesse dal processo di invecchiamento (Modificata da Abete et al., 2010).

della guanilatociclastasi, della proteina chinasi G (PKG) e della proteina chinasi C (PKC). La PKC può essere anche attivata direttamente dal recettore del peptide natriuretico mediante l'adenosina o la guanilatociclastasi.

Tutti questi eventi conducono all'apertura dei canali del potassio ATP-dipendenti mitocondriali (mitoKATP) attraverso la ϵ -PKC. L'apertura dei canali mitoKATP

determina un afflusso di potassio con conseguente rigonfiamento dei mitocondri e produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS); i ROS provocano a loro volta la formazione della p38 chinasi mitogeno-attivata e l'attivazione della PKC e successivo "priming" del poro ed aumento della permeabilità mitocondriale (MPTP). Questo meccanismo è stato proposto come fase finale del pathway di segnalazione intra-

cellulare nel PI. Le attuali evidenze suggeriscono che durante la fase di preconditionamento il breve stimolo ischemico provoca un'apertura reversibile del MPTP e la successiva depolarizzazione mitocondriale con riduzione del gradiente per l'uptake di Ca^{2+} nella matrice, processi che in gran parte occorrono durante la ripercussione successiva ad una prolungato periodo ischemico. Durante la ripercussione precoce conseguente allo stimolo di preconditionamento, l'attivazione dei GPCR o di recettori per i fattori di crescita provoca a sua volta l'attivazione del programma della chinasi di salvataggio dall'insulto della ripercussione (RISK); quest'ultima prevede la parallela attivazione del PI3K/Akt e del sistema extracellulare regolato dalle chinasi con l'attivazione a valle della proteina chinasi ribosomale p70 S6 (p70S6K) e della glicogeno sintasi chinasi 3β (GSK3 β), le quali provocano l'inibizione dell'apertura del MPTP e quindi un incremento della sopravvivenza delle cellule miocardiche (4) (*Figura 1*).

Precondizionamento ischemico "cerebrale"

Il ruolo neuroprotettivo del PI cerebrale è dimostrato da studi su mammiferi in vivo e in vitro (14). Una prima prova del preconditionamento ischemico cerebrale veniva realizzata mediante l'induzione di un insulto ischemico sub-letale che proteggeva da successivi danni ischemici letali l'area ippocampale CA1 in modelli di gerbillo (15). Il PI cerebrale è stato confermato anche in diversi altri modelli sperimentali, come ad esempio l'ischemia transitoria focale o globale in modelli di ratto (16-18), il modello di ischemia focale (19), modelli di barriera emato-encefalica (20), culture di neuroni (21, 22), cellule di endotelio cere-

brale (23), e in sezioni ippocampali di ratto private dell'apporto di ossigeno e glucosio (24). Il PI cerebrale è stato dimostrato anche in uno studio condotto su 12 pazienti adulti con emorragia subaracnoidea aneurismatica mediante una transitoria (2 minuti) occlusione prossimale dell'arteria seguita da 30 minuti di ripercussione (25). In questo studio, un catetere inserito nell'arteria ha mostrato un miglioramento della tensione di ossigeno, dell'anidride carbonica e del pH nel tessuto a rischio di ischemia durante l'occlusione transitoria.

Numerosi stimoli e mediatori chimici possono essere considerati "triggers" di preconditionamento cerebrale: ipertermia, ipotermia, ipossia, specie reattive dell'ossigeno, citochine infiammatorie, inibizione mitocondriale, resveratrolo, anestetici volatili, attivatori dei canali K-ATP, antibiotici, proteina basica della mielina ed E-selectina, sono tutti fattori in grado di fornire resistenza al danno ischemico cerebrale (26).

Numerosi studi clinici supportano l'esistenza del fenomeno di PI nel cervello umano. L'equivalente clinico di PI cerebrale è l'attacco ischemico cerebrale transitorio (TIA), la cui presenza determina una migliore prognosi nei pazienti con ictus ischemico rispetto a quelli senza storia di pregresso TIA (27-31). In uno studio retrospettivo caso-controllo condotto su 148 pazienti adulti con ictus, outcomes favorevoli sono risultati significativamente associati ai casi che avevano subito un precedente TIA (27). In un altro studio, su 2.490 pazienti di età <65 anni con diagnosi di ictus, 293 pazienti con storia di TIA omolaterale pochi giorni prima dell'evento ischemico cerebrale avevano esiti neurologici favorevoli rispetto ai pazienti senza precedenti TIA (28). Il TIA che precede l'ictus è stato associato a esiti favorevoli anche in caso di ictus non lacunare, come

dimostrato in un altro studio su 1.753 pazienti di età <65 anni (31). Inoltre è stato dimostrato un miglioramento del punteggio della National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) in pazienti adulti con storia di TIA 1-7 giorni prima dello stroke ischemico (32). Infine, le immagini di risonanza magnetica del cervello di pazienti con danno cerebrale ischemico, con e senza TIA antecedente, dimostravano che l'estensione della lesione era chiaramente minore nei pazienti che avevano avuto precedenti TIA (30). Al contrario, uno studio su una coorte di 180 pazienti con TIA e successivo ictus ischemico sopravvenuto entro 90 giorni non mostrava corrispondenza tra la durata del TIA e la probabilità di disabilità derivante da un successivo ictus; inoltre, non vi era alcuna differenza in termini di disabilità tra i pazienti nei quali l'ictus si era verificato entro 1 giorno, tra 1 e 7 giorni, o tra 7 e 90 giorni dopo il TIA (33).

Riduzione età-correlata del preconditionamento ischemico

Diversi studi sperimentali e clinici avevano dimostrato una riduzione età-correlata della protezione fornita dal PI nel cuore invecchiato (4), inizialmente con esperimenti su cuore isolato e perfuso di ratti dell'età di 24 mesi sottoposti a PI mediante un breve periodo di ischemia (2 minuti) seguito da 10 minuti di riperfusione, dato confermato da successivi numerosi studi (Figura 2A) (34).

Come sottolineato in precedenza, l'angina pre-infartuale è stata identificata come l'equivalente clinico di PI. Infatti, l'angina che precede entro 48 ore un infarto del miocardio esercita un effetto positivo sugli outcomes relativi all'ospedalizzazione in pazienti adulti di età <65 anni, ma non nei

pazienti di età ≥ 65 anni (Figura 2B) (35). È interessante notare che la restrizione calorica e l'attività fisica, da sole ma soprattutto in combinazione tra loro, sono in grado di ripristinare la protezione mediata dal PI nel cuore invecchiato sia nell'animale da esperimento che nell'uomo (36-38).

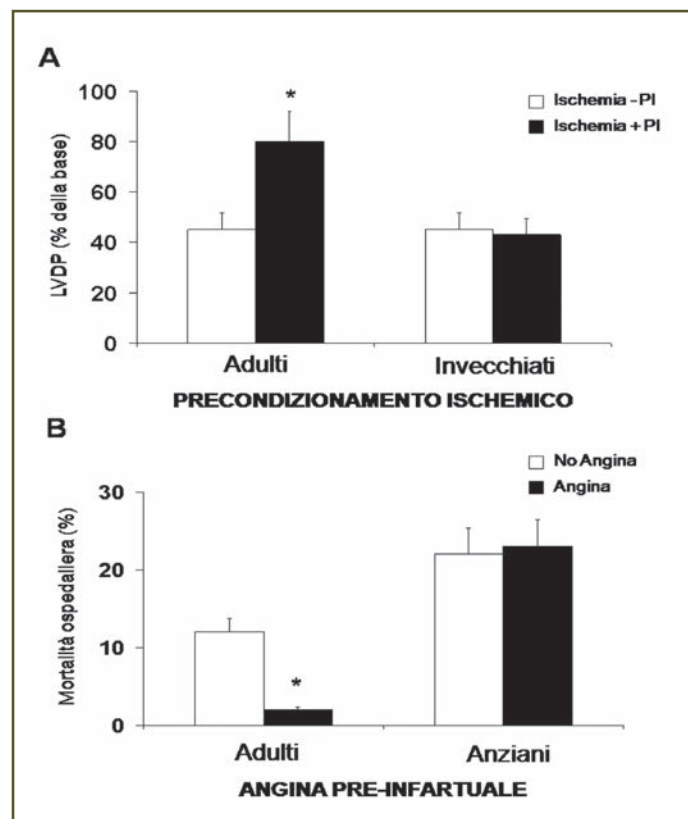


Figura 2 - Riduzione età - correlata del preconditionamento ischemico nel cuore di ratto isolato e perfuso (A): le colonne mostrano la percentuale di recupero, alla fine della riperfusione, della pressione sviluppata nel ventricolo sinistro (LVDP) in cuori di animali adulti ed invecchiati sottoposti a 20 min. di ischemia e riperfusione per 40 min (Ischemia - IP) e sottoposti a stimolo preconditionante ischemico per 2 minuti seguiti da 10 min. di riperfusione e successivo periodo ischemia-riperfusione (Ischemia + IP) (* $p < 0.01$ vs Ischemia - IP) (modificato da Abete et al., 1996). La riduzione dell'effetto protettivo dell'angina pre-infartuale, quale equivalente clinico del preconditionamento ischemico è mostrata in B: le colonne mostrano la percentuale di mortalità ospedaliera per infarto acuto del miocardio in pazienti adulti ed anziani con e senza angina pre-infartuale (* $p < 0.01$ vs No Angina) (modificato da Abete et al., 1997).

Riduzione età-correlata del preconditionamento ischemico "cerebrale"

L'effetto protettivo del PI nel cervello è stato ben stabilito in molti studi su animali (39). Tuttavia non è ancora chiaro se il PI sia presente nel cervello invecchiato (40). Negli animali giovani il PI protegge i neuroni della regione CA1 dell'ippocampo dall'ischemia globale (18). In una popolazione di gerbilli invecchiati (età compresa tra 18 e 20 mesi), dieci giorni dopo l'ischemia si era ottenuta la protezione di oltre

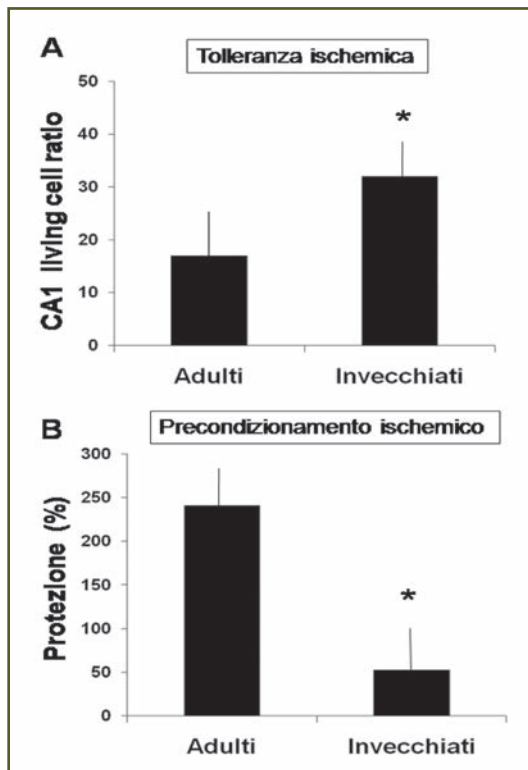


Figura 3 - Riduzione età - correlata della tolleranza all'ischemia cerebrale (A): il "cerebral CA1 living cell ratio" era maggiore nell'animale adulto sottoposto ad ischemia rispetto a quello invecchiato (32+/-6% vs.17+/-5%, *=p<0.05). La riduzione età-correlata del preconditionamento ischemico cerebrale nell'animale invecchiato è mostrata in B (adulto: 241+/-25%, vs invecchiato: 53+/-17% p<0.0001) (B) (modificato da He et al., 2005).

l'80% dei neuroni dell'area CA1 in animali con preconditionamento ischemico rispetto al 6% nel caso dei gerbilli ischemici. (41). In pratica, il PI sembra fornire una sostanziale neuro-protezione, ma lo studio non ha confrontato animali giovani vs quelli invecchiati. In un altro studio in cui ratti adulti ed invecchiati (tra 4 e 24 mesi di vita) erano stati sottoposti a PI (cioè a 3 minuti di ischemia), seguito da un'ischemia di 10 minuti, venivano eseguite a distanza di 8 giorni dall'ischemia alcune valutazioni istologiche e sull'immunoreattività del recettore per l'acido N-metil-D-aspartico 1 (NMDAr1) e del caspase-3 active peptide (C3AP) nella regione CA1 dell'ippocampo. Lo studio ha mostrato che il grado di protezione del cervello nei confronti dell'ischemia completa era ridotta nei ratti invecchiati e preconditionati se confrontati con i ratti adulti (Figura 3A-B) (42).

Analogamente al PI "cardiaco", l'equivalente clinico del PI "cerebrale" è rappresentato dall'attacco ischemico transitorio (TIA), ossia un breve evento ischemico che si verifica prima di un'ischemia prolungata nello stesso territorio vascolare responsabile poi dello stroke ischemico (39, 42). Studi condotti su pazienti di età <65 anni con ictus hanno mostrato risultati clinici favorevoli nei casi con precedenti TIA (27-31, 33). Allo stato attuale, i dati sul PI "cerebrale" in pazienti anziani con ictus sono limitati. In uno studio condotto su 203 pazienti di età ≥65 anni con diagnosi di ictus ischemico classificati in base alla presenza (n=42, 21%) o assenza (n=161, 79%) di TIA entro 72 ore dall'insorgenza dell'ictus, non sono emerse differenze significative nei punteggi di NIHSS e Rankin Scale Score modificata (Figura 4A-B) sia al momento del ricovero che alla dimissione, suggerendo che il meccanismo di protezione del PI cerebrale sia ridotto nei pazienti anziani (43).

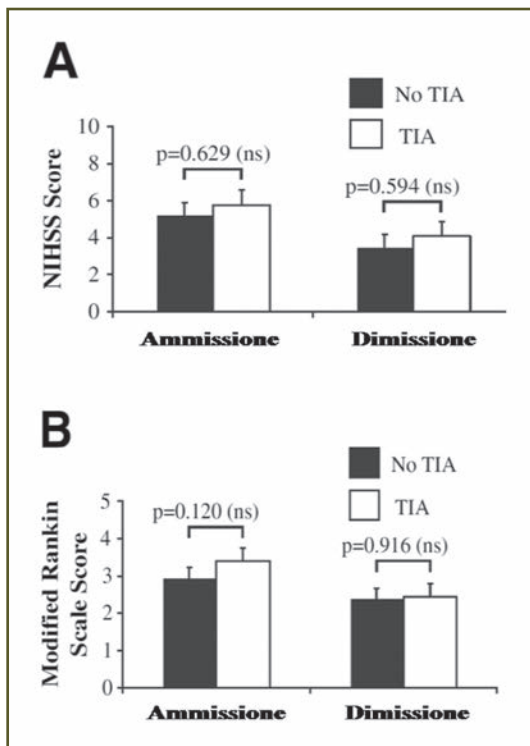


Figura 4 - Stato neurologico valutato con la NIHSS (A) e disabilità valutata con la "Rankin scale" modificata (B) in pazienti anziani con e senza TIA pre-ictale. (modificato da Della-Morte et al., 2009).

Meccanismi di riduzione età-correlata del preconditionamento ischemico

Ad oggi sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare la riduzione età-correlata della protezione mediata dal PI nel cuore: tra le ipotesi più accreditate, con l'invecchiamento vi sarebbe una riduzione del rilascio di noradrenalina in risposta allo stimolo di PI "cardiaco" (4). Inoltre, diversi studi hanno dimostrato una compromissione della fase di innesco del PI e dei meccanismi di trasduzione del segnale (ad es. adenosina, PKC, metabolismo mitocondriale, ecc.) (4).

In generale la compromissione della protezione PI-mediata nel cervello invec-

chiato può essere dovuta a molteplici meccanismi, tra i quali riduzione del numero di neuroni, alterazione nella funzione mitocondriale con un' aumentata produzione di ROS, alterazione dell'espressione genica, della regolazione metabolica e dell'omeostasi intracellulare del calcio. Tutte queste modifiche rendono l'organo più suscettibile a fattori stressanti di varia natura tra i quali, appunto, l'ischemia cerebrale (39). In particolare, i profili dell'espressione genica conseguente all'ischemia cerebrale mostrano una ridotta attività trascrizionale, una up-regulation di geni pro-apoptotici ed una down-regulation dell'assono- e neuro-genesi nell'area peri-infartuale, che sono più marcate negli animali invecchiati rispetto a quelli adulti (39). Questi risultati suggeriscono che l'invecchiamento cerebrale provocherebbe una up-regulation dell'espressione genica, ma la risposta è spesso sfumata e temporalmente non coordinata in seguito all'ischemia cerebrale (44).

Prospettive terapeutiche

È ormai accertato che il PI può essere utile nell'ambito della cardiocirurgia e del trapianto cardiaco come meccanismo aggiuntivo di protezione (11). Allo stato attuale non sono ancora disponibili farmaci e/o tecniche da applicare alla pratica clinica che siano in grado di mimare l'effetto protettivo del PI nel cervello (45). Recentemente sono stati proposti gli attivatori ed inibitori selettivi dell'isoenzima PKC come potenziali composti terapeutici sia a livello cardiaco che cerebrale in virtù della loro capacità di determinare effetti benefici o nocivi in risposta all'insulto ischemico (39, 44, 45). In particolare, i $\psi\epsilon$ -recettori per chinasi C attivata (RACK), un peptide attivatore ϵ PKC-selettivo, iniettato per via

endovenosa 30 minuti prima dell'induzione di ischemia cerebrale globale conferiva neuroprotezione nella regione ippocampale CA1 del ratto (46). Al contrario, nell'animale da esperimento, è stato dimostrato che un trattamento con inibitore specifico δ PKC (δ V1-1) prima dell'esposizione all'ischemia cerebrale migliorava la perfusione dopo 24 ore e riduceva la morte neuronale a livello della regione CA1 dell'ippocampo 7 giorni dopo l'occlusione dell'arteria (47).

Tali risultati suggeriscono un ruolo opposto tra δ PKC e ϵ PKC nel meccanismo di neuroprotezione PI-mediata. Infine il resveratrolo, un polifenolo naturale presente nell'uva e nel vino, sarebbe in grado di mimare il PI inducendo neuroprotezione nei confronti dell'insulto ischemico in studi sia in vitro che in vivo (26, 48): sia il resveratrolo che il PI sono in grado di incrementare l'attività della SIRT1 e ridurre la proteina di disaccoppiamento 2 (UCP2) a livello mitocondriale, con conseguente aumento del consumo di ossigeno mitocondriale a livello dell'ippocampo. A tutt'oggi non sono noti gli effetti positivi generati dall'esercizio fisico e dalla restrizione calorica sul ripristino del PI nel cervello dell'anziano (4).

Conclusioni

Tutte le evidenze finora disponibili dimostrano chiaramente che il preconditionamento ischemico cerebrale in risposta ad un breve periodo di ischemia attiverebbe specifici pathways in grado di proteggere il cervello da un insulto ischemico prolungato e migliorerebbe la prognosi in caso di successivi eventi ischemici. Tale potente meccanismo protettivo sembrerebbe tuttavia ridursi con l'invecchiamento cerebrale, come dimostrato da molteplici studi sull'animale da esperimento e nell'uomo.

L'eventuale assenza della capacità di preconditionamento nel cervello potrebbe quindi in parte spiegare la più elevata mortalità per ictus osservata nel paziente anziano.

Alcuni presidi in grado di mimare l'effetto del preconditionamento "cerebrale" potrebbero infine rappresentare una nuova e potente opzione terapeutica per il trattamento dell'ictus ischemico nell'anziano, ma sono necessari ulteriori studi per comprendere il meccanismo alla base della riduzione del PI cerebrale legata all'invecchiamento e poter trasferire queste evidenze nella pratica clinica.

RIASSUNTO

L'ictus ischemico è una delle principali cause di morte nei paesi industrializzati in soggetti di età superiore ai 65 anni. Le ragioni sono ancora da chiarire, ma tra queste è stata proposta una riduzione dei meccanismi endogeni di difesa nei confronti degli insulti ischemici. Il meccanismo di preconditionamento ischemico "cerebrale" è caratterizzato da un breve episodio di ischemia che rende il cervello più resistente nei confronti di successivi eventi ischemici prolungati: tale "tolleranza ischemica" è stata dimostrata in numerosi modelli sperimentali di ischemia cerebrale ed in alcuni studi clinici. Tuttavia studi sia sperimentali che clinici hanno evidenziato una compromissione età - correlata dei meccanismi di preconditionamento ischemico cerebrale, probabilmente a causa di alterazioni del rilascio di mediatori e/o dei pathways intracellulari. Un nuovo potente strumento per il trattamento dell'ictus ischemico nell'anziano potrebbe quindi essere rappresentato da agenti in grado di mimare l'effetto del preconditionamento ischemico "cerebrale", meccanismo che sembra essere compromesso con l'invecchiamento.

Parole chiave: Preconditionamento ischemico, ictus, attacco ischemico transitorio cerebrale, mortalità, anziano.

Bibliografia

1. De Frances CJ, Hall MJ, Podgornik MN, 2003 National Hospital Discharge Survey. Advance data from vital and health statistics. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics No 359, 2005.
2. Truelsen T, Piechowski Jozwiak B, Bonita R et al. Stroke incidence and prevalence in Europe: A review of available data. *Eur J Neurol* 2006; 13: 581-598.
3. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013; 127: 143-152.
4. Abete P, Cacciatore F, Testa G et al. Ischemic preconditioning in the aging heart: from bench to bedside. *Ageing Res Rev* 2010; 2: 153-162.
5. Comfort A. Biological theories of aging. *Hum Dev* 1970, 13: 127-139.
6. Jahangir A, Sagar S, Terzic A. Aging and cardioprotection. *J Appl Physiol* 2007; 103: 2120-2128.
7. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.
8. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003; 26: 248-254.
9. Liu XQ, Sheng R, Qin ZH. The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30: 1071-1080.
10. Kloner RA, Bolli R, Marban E et al. Medical and cellular implications of stunning, hibernation and preconditioning. An NHLBI workshop. *Circulation* 1998; 97: 1848-1867.
11. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83: 1113-1151.
12. Przyklenk K, Whittaker P. Remote ischemic preconditioning: current knowledge, unresolved questions, and future priorities. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011; 16: 255-259.
13. Vinten Johansen J, Shi W. Preconditioning and postconditioning: current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption, and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011; 16: 260-266.
14. Perez Pinzon MA. Neuroprotective effects of ischemic preconditioning in brain mitochondria following cerebral ischemia. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36: 323-327.
15. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990; 528: 21-24.
16. Stagliano NE, Perez Pinzon MA, Moskowitz MA et al. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 757-761.
17. Nishi S, Taki W, Uemura Y et al. Ischemic tolerance due to the induction of HSP70 in a rat ischemic recirculation model. *Brain Res* 1991; 615: 281-288.
18. Dave KR, Saul I, Busto R et al. Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1401-1410.
19. Chen Y, Ruetzler C, Pandipati S et al. Mucosal tolerance to E-selectin provides cell-mediated protection against ischemic brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15107-15112.
20. Gesuete R, Orsini F, Zanier ER et al. Glial cells drive preconditioning-induced blood-brain barrier protection. *Stroke* 2011; 42: 1445-1453.
21. Grabb MC, Choi DW. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. *J Neurosci* 1999; 19: 1657-1662.
22. Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M et al. Activation of the nuclear factor- κ B is a key event in brain tolerance. *J Neurosci* 2001; 21: 4668-1677.
23. Andjelkovic AV, Stamatovic SM, Keep RF. The protective effects of preconditioning on cerebral endothelial cells in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 1348-1355.
24. Xu GP, Dave KR, Vivero R et al. Improve-

- ment in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res* 2002; 952: 153-158.
25. Chan MT, Boet R, Ng SC et al. Effect of ischemic preconditioning on brain tissue gases and pH during temporary cerebral artery occlusion. *Acta Neurochir* 2005; (Suppl.) 95: 93-96.
 26. Kitagawa K. Ischemic tolerance in the brain: endogenous adaptive machinery against ischemic stress. *J Neurosci Res* 2012; 90: 1043-1054.
 27. Weih M, Kallenberg K, Bergk A et al. Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* 1999; 30: 1851-1854.
 28. Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J et al. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* 2000; 54: 2089-2094.
 29. Castillo J, Moro MA, Blanco M et al. The release of tumor necrosis factor-alpha is associated with ischemic tolerance in human stroke. *Ann Neurol* 2003; 54: 811-819.
 30. Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V et al. MRI in Acute Stroke Study Group of the German Competence Network Stroke. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 2004; 35: 616-621.
 31. Arboix A, Cabeza N, Garcia-Eroles L et al. Relevance of transient ischemic attack to early neurological recovery after nonlacunar ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2004; 18: 304-311.
 32. Schaller B. Ischemic preconditioning as induction of ischemic tolerance after transient ischemic attacks in human brain: Its clinical relevance. *Neurosci Lett* 2005; 377: 206-211.
 33. Johnston SC. Ischemic preconditioning from transient ischemic attacks? Data from the Northern California TIA Study. *Stroke* 2004; 35: 2680-2682.
 34. Abete P, Ferrara N, Cioppa A, et al. Preconditioning does not prevent post-ischemic dysfunction in aging heart. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1777-1786.
 35. Abete P, Ferrara N, Cacciatore F, et al. Angina-induced protection against myocardial infarction in adult and senescent patients. A loss of preconditioning mechanism in aging heart? *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 947-954.
 36. Abete P, Ferrara N, Cacciatore F, et al. High level of physical activity preserves the cardioprotective effect of preinfarction angina in elderly patients. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1357-1365.
 37. Abete P, Cacciatore F, Ferrara N, et al. Body mass index and preinfarction angina in elderly patients with acute myocardial infarction. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 796-801.
 38. Abete P, Cacciatore F, Della-Morte D, et al. Joint effect of physical activity and body mass index on mortality for acute myocardial infarction in the elderly: role of preinfarction angina as equivalent of IP. *Eur J Prev Cardiol* 2009; 16: 73-79.
 39. Perez Pinzon MA. Mechanisms of neuroprotection during ischemic preconditioning: lessons from anoxic tolerance. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 147: 291-299.
 40. Della Morte D, Caso V, Guadagni F. A Continuous Debate about Cerebral Ischemic Preconditioning in the Elderly. *J Neurol Neurophysiol* 2011; 2: 101e.
 41. Dowden J, Corbett D. Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures. *Stroke* 1999; 30: 1240-1246.
 42. He Z, Crook JE, Meschia JF et al. Aging blunts ischemic preconditioning-induced neuroprotection following transient global ischemia in rats. *Curr Neurovasc Res* 2005; 2: 365-374.
 43. Della Morte D, Abete P, Gallucci F et al. Transient ischemic attack before nonlacunar ischemic stroke in the elderly. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2008; 17: 257-262.
 44. Della Morte D, Guadagni F, Palmirotta R et al. Genetics of ischemic stroke, stroke-related risk factors, stroke precursors and treatments. *Pharmacogenomics* 2012; 13: 595-613.
 45. Koch S, Sacco RL, Perez-Pinzon MA. Preconditioning the brain: moving on to the next frontier of neurotherapeutics. *Stroke* 2012; 43: 1455-1457.

46. Della Morte D, Raval AP, Dave KR et al. Post-ischemic activation of protein kinase C epsilon protects the hippocampus from cerebral ischemic injury via alterations in cerebral blood flow. *Neurosci Lett* 2012; 487: 158-162.
47. Lin HW, Della-Morte D, Thompson JW et al. Differential effects of delta and epsilon protein kinase C in modulation of postischemic cerebral blood flow. *Adv Exp Med Biol* 2010; 737: 63-69.
48. Della Morte D, Dave KR, De Fazio RA et al. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a Sirtuin 1-Uncoupling Protein 2 pathway. *Neuroscience* 2009; 159: 993-1002.