

STRESS OSSIDATIVO... ADDIO

Uno studio in vitro sulle proprietà antiossidanti dell'integratore nutrizionale CELLFOOD® che dimostra la sua efficacia protettiva nei confronti del danno ossidativo a biomolecole e cellule.

AUTORI:

Simona Catalani, Serena Benedetti, Francesco Palma, Franco Canestrari.

Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sezione di Biochimica Clinica, Università di Urbino "Carlo Bo".

Introduzione

Lo stress ossidativo - lo squilibrio tra la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e meccanismi di difesa antiossidante - è causa di reazioni citotossiche che portano a processi di invecchiamento cellulare e all'insorgenza di disordini cronico-degenerativi quali neoplasie, aterosclerosi e neurodegenerazione (1). Negli ultimi anni il tradizionale approccio terapeutico a queste patologie si è aperto sempre di più al contributo dei supplementi antiossidanti, tra cui l'integratore naturale CELLFOOD® (CF).

CF, noto anche come *Deutrosulphazyme*, è una formula altamente concentrata contenente 78 elementi e minerali in forma ionica e colloidale presenti in tracce, combinati con 34 enzimi e 17 aminoacidi, il tutto sospeso in una soluzione di solfato di deuterio (2). Studi presenti in letteratura rendono CF particolarmente interessante come integratore nutrizionale ad azione antiossidante. Per prima cosa, l'efficacia di CF è stata dimostrata nel trattamento della fibromialgia, una sindrome in cui lo stress ossidativo generato da disfunzioni mitocondriali ha un fondamentale ruolo eziopatogenetico (3). Nello studio si è osservato che, rispetto al placebo, CF attenuava in maniera significativa la sintomatologia dolorosa, la debolezza muscolare e in generale i disturbi associati alla riduzione del tono dell'umore. In secondo luogo, l'efficacia di CF è stata riscontrata in atleti professionisti con benefici sia durante le fasi di allenamento che durante le performance agonistiche

(4). Tenuto conto che l'esercizio fisico intenso è associato a una forte produzione di ROS, gli effetti positivi di CF potrebbero essere legati anche in questo caso alla sua azione antiossidante.

Quindi, per comprendere meglio i meccanismi d'azione alla base dell'efficacia di tale integratore, sono stati investigati *in vitro* gli effetti protettivi di CF nei confronti del danno ossidativo, sia in sistemi acellulari quali le biomolecole glutatione (GSH) e DNA, sia in sistemi cellulari quali i globuli rossi (RBC) e i linfociti. Come fonti di radicali liberi sono stati utilizzati tre ossidanti fisiologici quali perossido di idrogeno (H_2O_2), acid ipocloroso (HOCl) e perossiradicali ($ROO\cdot$).

Materiali e metodi

La protezione di CF (range di diluizioni testate 1:5000-1:100) nei confronti dell'ossidazione dei gruppi tiolici del GSH da parte dei tre ossidanti è stata valutata spettrofotometricamente a 412 nm

(5). La valutazione degli effetti protettivi di CF (range di diluizioni testate 1:1250-1:125) verso il danno ossidativo al DNA, in presenza degli agenti ossidanti, è stata effettuata mediante l'analisi elettroforetica (6). Nel caso degli RBC, l'efficacia protettiva di CF (range 1:4000-1:250) nei confronti dell'emolisi ossidativa è stata determinata misurando il rilascio di emoglobina a 540 nm (7), mentre la protezione di CF nei confronti della deplezione del GSH eritrocitario da parte degli ossidanti è stata valutata a 412 nm (5). Infine, la protezione di CF (range di diluizioni 1:1000-1:62.5) nei confronti dello stress ossidativo nei linfociti è stata valutata mediante la sonda fluorescente DCFH-DA (maggiore è la fluorescenza emessa maggiore è l'ossidazione cellulare) (8).

Risultati

Per quanto riguarda le biomolecole, gli agenti ossidanti H_2O_2 , HOCl e $ROO\cdot$ causano una forte ossidazione dei gruppi tiolici del GSH portando ad una sua significativa riduzione nella miscela di reazione (Figura 1); allo stesso tempo, causano una forte riduzione dell'integrità della molecola di DNA (Figura 2). Quando l'ossidazione avviene in presenza di CF si osserva un aumento dose-dipendente sia della concentrazione del GSH sia dell'integrità del DNA.

Per quanto riguarda i sistemi cellulari, l'ossidazione degli RBC provoca una forte lisi cellulare con rilascio di emoglobina e incremento dell'assorbimento a 540 nm (Figura 3); quando l'ossidazione avviene in presenza di CF si evidenzia una riduzione dose-dipendente dell'emolisi eritrocitaria. L'ossidazione degli RBC induce anche una deplezione dei livelli intracellulari di GSH (Figura 4); in presenza di CF si osserva una inibizione dose-dipendente del consumo di GSH. Nel caso dei linfociti, gli agenti ossidanti inducono un forte aumento dello stress ossidativo intracellulare (Figura 5); quando l'ossidazione avviene in presenza di CF si evidenzia una riduzione dose-dipendente dell'accumulo cellulare di radicali liberi.

Discussioni

In questo studio sono state investigate per la prima volta le proprietà antiossidanti *in vitro* di CF valutando la sua efficacia protettiva nei confronti di tre agenti ossidanti fisiologici quali perossido di idrogeno, perossiradicali e acido ipocloroso. I risultati ottenuti dimostrano che CF protegge efficacemente il GSH dall'ossidazione e quindi dal suo consumo in presenza di radicali liberi. In questo modo CF permette di preservare un antiossidante fondamentale deputato al mantenimento dell'equilibrio redox intracellulare. L'effetto protettivo di CF si estende anche al DNA, riducendo gli effetti genotossici degli agenti ossidanti. Tale azione può avere grande rilevanza nel caso del DNA mitocondriale che è direttamente esposto all'azione dei ROS prodotti durante la respirazione cellulare. È stato infatti dimostrato che il danno ossidativo al DNA mitocondriale è implicato nel processo di senescenza fisiologica e in alcuni disordini degenerativi (9). La supplementazione con CF potrebbe dunque svolgere un ruolo protettivo in tutti quei disordini associati alle disfunzioni mitocondriali, come si è già osservato nella fibromialgia (3).

Essendo particolarmente suscettibili al danno ossidativo, anche gli eritrociti sono stati scelti come modello di studio per valutare le proprietà antiossidanti di CF. Come risultato, è emerso che CF protegge efficacemente gli RBC dalla lisi ossidativa preservando allo stesso tempo le difese antiossidanti eritrocitarie (il GSH) dalla deplezione. Tale protezione si ha nei confronti sia di

ossidanti intracellulari (come perossido di idrogeno e perossiradicali) sia di quelli generati dai neutrofilo come l'acido ipocloroso. Queste evidenze possono avere un'importante rilevanza in ambito sportivo, infatti durante l'esercizio fisico intenso viene prodotta una maggior quantità di ROS derivanti sia dall'aumentato metabolismo eritrocitario sia dall'attivazione leucocitaria (neutrofilo) (10). Poichè i meccanismi di riparo eritrocitari sono limitati, si possono accumulare lesioni ossidative con conseguente lisi cellulare e insorgenza di uno stato anemico (11). La protezione di CF nei confronti del danno ossidativo agli RBC potrebbe dunque essere un utile strumento nel contrastare l'anemia dell'atleta e potrebbe spiegare alcuni degli effetti positivi di CF in atleti professionisti (4).

Infine, l'azione protettiva di CF è stata investigata nei linfociti, cellule coinvolte nella risposta immunitaria, che normalmente sono soggetti a stress ossidativo *in vivo*. Anche in questo modello sperimentale è stato osservato che CF è capace di ridurre significativamente la formazione di ROS intracellulari indotta dai tre ossidanti.

Conclusioni

I dati emersi in questo studio confermano l'azione protettiva antiossidante di CELLFOOD[®], rendendolo un valido integratore nutrizionale nella prevenzione e nel trattamento di numerose condizioni fisiopatologiche legate allo stress ossidativo, dall'invecchiamento all'anemia dello sportivo, dalla sindrome fibromialgica al rischio cardiovascolare, dai disordini neurodegenerativi al cancro.

Bibliografia

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press; 1999.
2. Dyer DS. CELLFOOD®. Vital cellular nutrition for the new millennium. Feedback Books Inc; 2000.
3. Nieddu ME, Menza L, Baldi F, Frediani B, Marcolongo R. Efficacy of Cellfood's therapy (deutrosulfazyme) in fibromyalgia. *Reumatismo* 2007;59:316-21.
4. Milić R., Djordjević S. Cycling performance and Cellfood. In: Loland SBØK, Fasting K, Hallén J, Ommundsen Y, Roberts G, Tsolakidis E, editors. Book of Abstracts of the 14th Annual Congress of the European College of Sport Science. Oslo: Gamlebyen Grafiske AS; 2009, p. 230.
5. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione. *Methods Enzymol* 1994; 233: 380
6. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor; 1989.
7. Kwak, C. S., Mun, K. C., and Suh, S. I. (2002) Production of oxygen free radicals and of hemolysis by cyclosporine. *Transplant. Proc.* 34, 2654–2655
8. Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1575-82.
9. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999;283:1482-8.
10. Santos-Silva A, Rebelo MI, Castro EM, Belo L, Guerra A, Rego C, et al. Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clin Chim Acta* 2001;306:119-26.
11. Robinson Y, Cristancho E, Böning D. Intravascular hemolysis and mean red blood cell age in athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38:480-3.

FIGURE

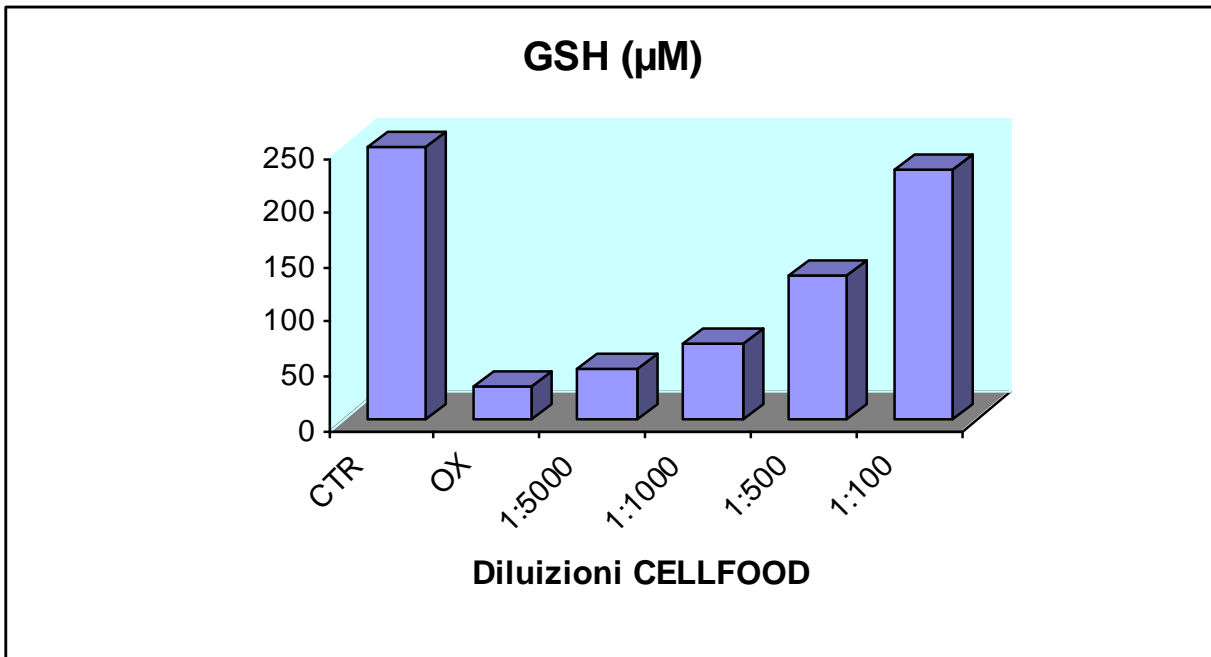


Figura 1 Aumento della concentrazione di glutatione in presenza di CELLFOOD

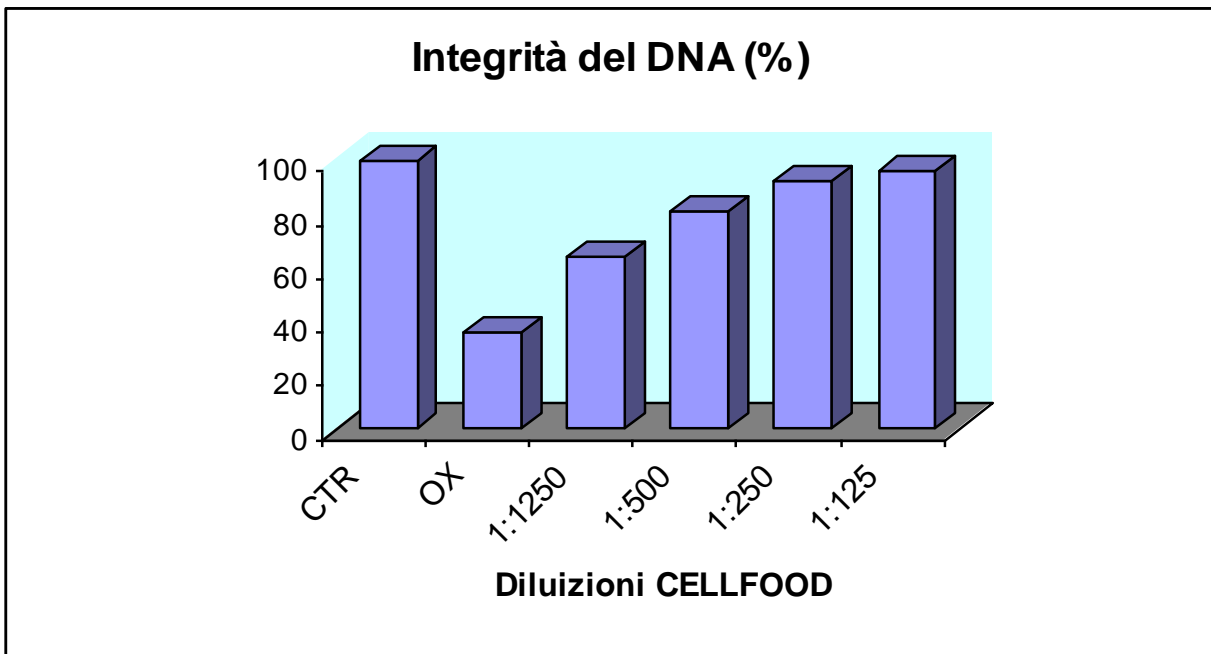


Figura 2 Aumento dell'integrità del DNA in presenza di CELLFOOD

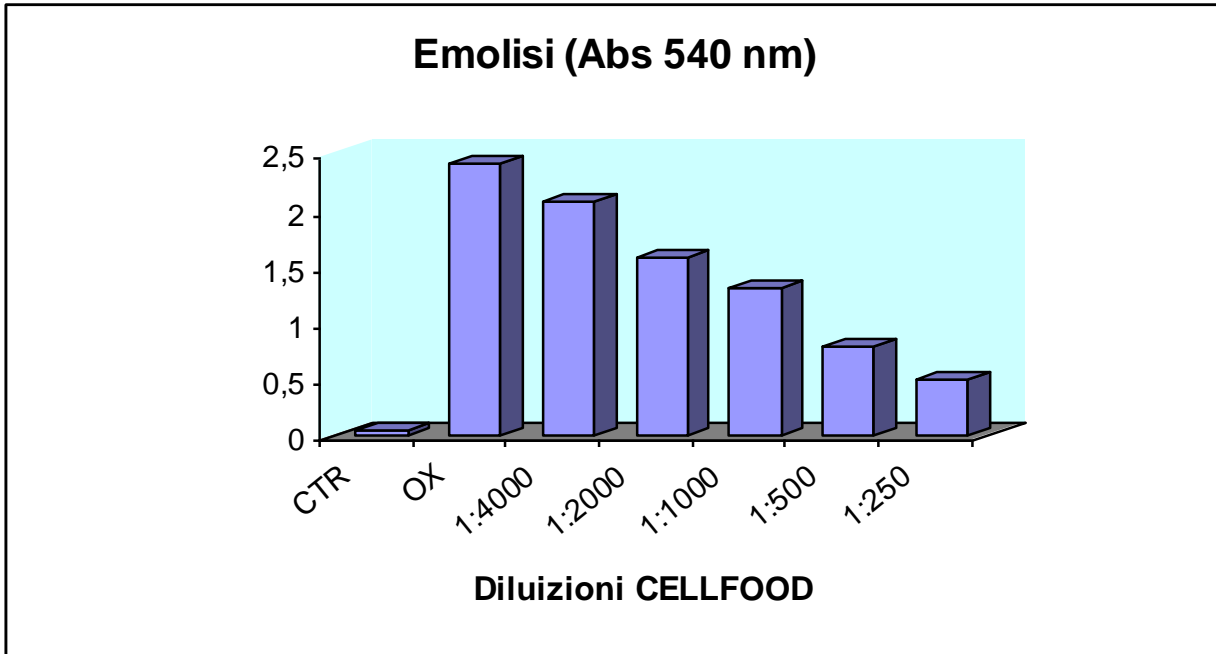


Figura 3 Decremento dell'emolisi eritrocitaria in presenza di CELLFOOD

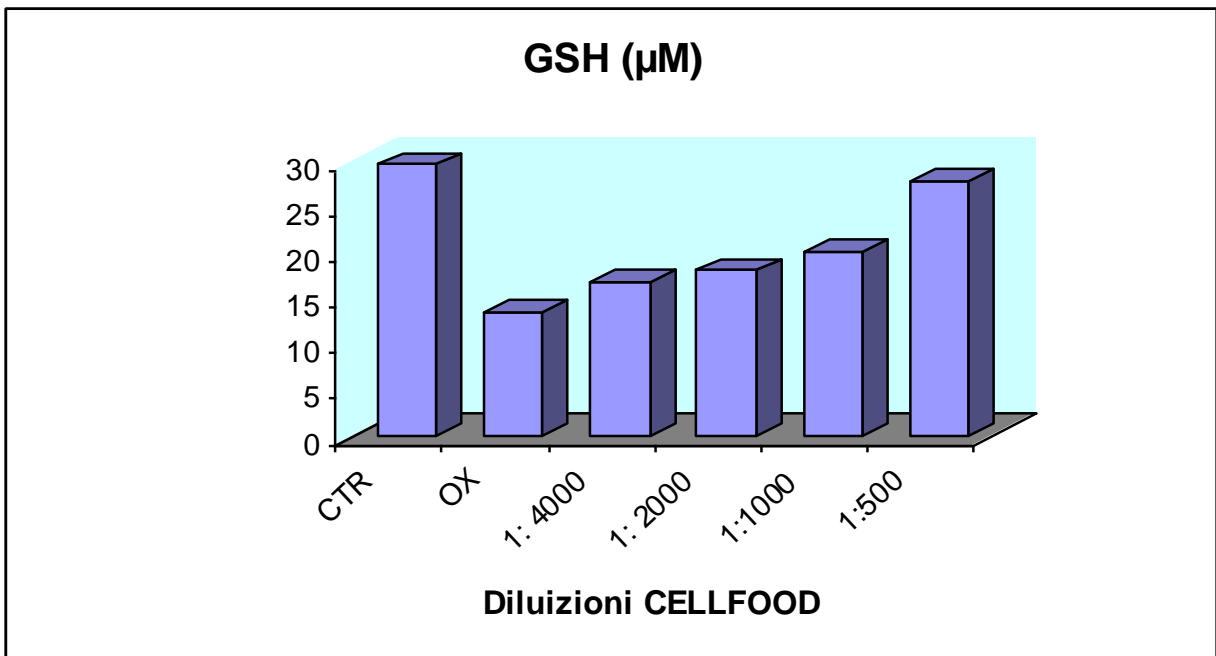


Figura 4 Aumento della concentrazione di GSH eritrocitario in presenza di CELLFOOD

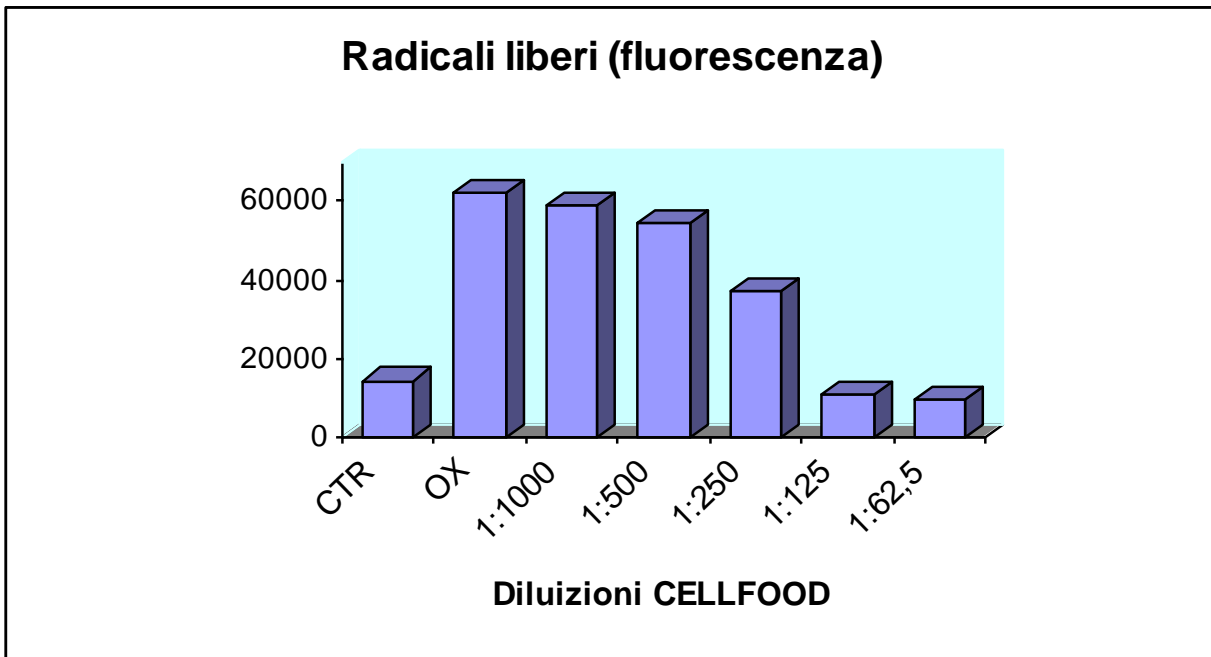


Figura 5 Decremento della formazione di radicali liberi linfocitari in presenza di CELLFOOD