

RUOLO PROFILATTICO ANTIOSSIDANTE DELL'ACQUA SOLFUREA DELLE TERME DI SATURNIA

Antioxidant prophylactic role of sulphurous water by thermal centre of Saturnia

¹S. Pagliarani, ¹S. Benedetti, ³N. A. Fortunati, ²G. Nappi, ³P. Calcaterra, ³D. Mazzone,
²S. De Luca, ¹F. Benvenuti, ¹S. Francogli, ¹F. Canestrari

¹Istituto di Istologia e Analisi di Laboratorio,
Università di Urbino "Carlo Bo"

²Centro di Studi e Ricerche in Medicina Termale,
Università di Milano

³Terme di Saturnia, Grosseto

CORRESPONDING AUTHOR

Benedetti Serena

Istituto di Istologia e Analisi di Laboratorio,
Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo",

Via Zeppi - 61029 Urbino (PU), Italia

Tel: 0722 351477 Fax: 0722 322370

e-mail: s.benedetti@uniurb.it

RIASSUNTO

Lo zolfo, componente chiave di alcune fondamentali molecole antiossidanti come il glutathione, esercita un ruolo importante nelle strategie antiossidanti contro i radicali liberi.

I trattamenti termali basati sullo zolfo sono ampiamente diffusi grazie ai loro effetti benefici, comunque, fino ad oggi, si conosce ancora poco riguardo alle possibili proprietà antiossidanti delle acque che contengono zolfo su soggetti sottoposti a trattamenti termali idropinici.

Per esaminare meglio questi aspetti, sono stati presi in esame soggetti sani determinando l'effetto della somministrazione di acqua sulfurea (500 ml assunti giornalmente per 15 giorni) sul profilo antiossidante e su alcuni indici di stress ossidativo. I campioni di sangue da esaminare sono stati raccolti all'inizio del trattamento (T0), dopo 15 giorni di cura idropinica (T1) e 15 giorni dopo la sospensione del trattamento (T2). In base ai risultati ottenuti, rispetto alla valutazione basale (T0), al tempo T1 è stato evidenziato un significativo incremento della capacità antiossidante totale del plasma associato ad un significativo decremento dei marcatori di ossidazione lipidica e proteica. È interessante notare che questi effetti sono stati osservati anche 15 giorni dopo la fine del trattamento (T2). Da qui si può concludere che la scoperta, circa il miglioramento dello stato redox del corpo, suggerisce come si possano ricevere sostanziali benefici dall'acqua sulfurea la quale può ridurre il rischio di malattie degenerative e di quelle correlate all'età, nelle quali il livello di stress ossidativo del corpo gioca un ruolo importante nella patogenesi.

SUMMARY

Sulphur, a key component of some fundamental antioxidant molecules like glutathione, plays an important role in the antioxidant strategies against free radicals. Sulphur-based thermal treatments are widely diffuse thanks to their beneficial effects; however, to date, little is known about the possible antioxidant effects of sulphur-containing waters in subjects receiving thermal hydropinic treatments. To better investigate these aspects, we determined the effect of sulphurous water administration (500 ml daily for 15 days) on the antioxidant profile and some indices of oxidative stress in healthy subjects. Blood samples were collected at baseline (T0), after 15 days of drinking sulphurous water (T1) and 15 days after the treatment was suspended (T2). With respect to the basal evaluation, at T1 a significant increment of plasma total antioxidant capacity together with a significant decrement of lipid and protein oxidation markers was detected.

Interestingly, these effects were still observed 15 days after the suspension of water administration (T2).

Our findings of improved body redox status suggest major benefits from sulphurous water that may reduce the risk of age-related and degenerative diseases in which the level of body oxidative stress may play a pathogenic role.

INTRODUZIONE

Lo stress ossidativo è definito come “uno sbilanciamento tra le specie reattive dell'ossigeno e/o dello zolfo (ROS e/o RNS) e le difese antiossidanti”. Le conseguenze del danno alle bio-molecole, quali proteine, lipidi e acidi nucleici, sono il danno strutturale e funzionale sia a livello cellulare che tissutale e la genesi di eventi fisiopatologici come l'invecchiamento e le malattie cronico-degenerative [1, 2, 3].

Per contrastare l'eccessiva produzione di radicali liberi sia endogeni che esogeni, le cellule hanno sviluppato sistemi enzimatici e non-enzimatici capaci di convertire ROS e RNS in forme meno tossiche. In ogni caso, la bilancia non è perfetta, tanto che, anche nelle persone sane, si riscontra un certo grado di danno ossidativo.

Lo zolfo è un elemento essenziale non-metallico rappresentato ampiamente nel corpo umano (approssimativamente 175 g di zolfo per 70 kg di peso corporeo) [4,5]. Esso è coinvolto nella biosintesi di co-fattori vitali ed è componente di un grande numero di molecole fondamentali come aminoacidi, proteine ed enzimi, ormoni come l'insulina, molecole antiossidanti quali il glutatione [5]. Inoltre è dotato di importanti proprietà terapeutiche ed è fondamentale nelle cartilagini, nel fegato, nell'apparato respiratorio, nella pelle. Per questi motivi, lo zolfo ed i composti contenenti zolfo, sono sottoposti ad intense indagini.

Fin dai tempi antichi lo zolfo, presente nelle acque sulfuree, è stato utilizzato a scopi terapeutici. Le acque sulfuree somministrate attraverso le cure termali, con le loro proprietà chimiche e fisiche apportano grandi benefici all'organismo.

Le cure termali, nelle loro diverse forme, sono dunque una “medicina naturale” di grande rilievo utilizzata a scopi terapeutici per la cura, ad esempio, delle malattie che coinvolgono l'apparato muscolare e quello scheletrico [6].

In questo contesto, Leibetseder e colleghi [7] hanno recentemente dimostrato che la balneoterapia esercita effetti benefici sui livelli di omocisteina plasmatica in soggetti affetti da osteoartrite degenerativa.

In precedenza, era stata osservata l'influenza positiva delle cure idropiniche sullo stato antiossidante sia in modelli animali che umani; in particolare, si era evidenziato, in conigli trattati con acque sulfuree per un mese, un incremento del glutatione ridotto biliare, un decremento del glutatione ossidato sia biliare che ematico e una diminuzione dell'ossidazione lipidica eritrocitaria [8].

Conseguentemente, in ratti trattati per tre mesi con acqua sulfurea, le concentrazioni di glutatione eritrocitario ed epatico erano aumentate [9]. Questi dati erano stati confermati anche in soggetti umani che avevano assunto acqua sulfurea per due settimane [10].

Perciò è probabile che le acque sulfuree giochino un ruolo importante nelle strategie antiossidanti contro i radicali liberi, anche se i meccanismi molecolari sono ancora sconosciuti.

Probabilmente, il solfuro d'idrogeno, H₂S, gioca un ruolo fondamentale come agente antiossidante e, secondariamente, potrebbe promuovere quelle reazioni che coinvolgono altre molecole antiossidanti quali il glutatione.

Lo scopo di questo studio è stato quello di investigare l'effetto a breve termine del trattamento idropinico, che consiste nell'assunzione giornaliera di acqua sulfurea attraverso bevande, su alcuni indici di stress ossidativo e sul profilo antiossidante in soggetti sani che conducono una vita normale e hanno una dieta variegata, tenendo conto che la risposta al trattamento è strettamente associata alle caratteristiche intrinseche dell'acqua.

MATERIALI E METODI

Soggetti

Per questo studio sono stati reclutati, previo consenso informato, 21 soggetti (M=9, F=12, di età compresa tra 41 e 55 anni). Tutti i partecipanti allo studio erano in buona salute, come evidenziato da un questionario medico, da un esame fisico e dai valori, risultati nella norma, dei test clinici di laboratorio. Ciascun partecipante doveva soddisfare i seguenti criteri di eleggibilità: 1) nessun precedente di malattie cardiovascolari, epatiche, gastrointestinali o renali; 2) assenza di alcolismo; 3) assenza di assunzione antibiotica o di supplementazione vitaminica e/o minerale per almeno 4 settimane prima dell'inizio dello studio e 4) non fumatori. Il protocollo dello studio era in accordo con la Dichiarazione di Helsinki del 1975, rivista nel 1983.

Piano sperimentale

Il trattamento idropinico è stato effettuato presso il Centro Termale di Saturnia (Grosseto); nella **Tabella 1** sono riassunte le principali

caratteristiche chimiche specifiche per queste acque, che evidenziano un livello solfidrimetrico di 14.5 mg/l. Tutti i soggetti presi in esame nello studio hanno assunto giornalmente 500 ml di acqua sulfurea (consumata entro 2 ore dall'apertura della bottiglia) per un periodo di 15 giorni.

Tabella 1
Caratteristiche chimiche delle acque sulfuree di Saturnia

Temperatura	°C	36.9
pH (25°C)	-	6.25
Conducibilità El. Spec 25°C	°S/cm	2996
Durezza	°F	204
Residuo fisso a 180°C	mg/l	2.99
Grado solfidrimetrico (SH-)	mg/l	14.5
CO ₂	mg/l	674
Ca ⁺⁺	mg/l	598
Mg ⁺⁺	mg/l	134
Na ⁺	mg/l	63.7
K ⁺	mg/l	9.3
HCO ₃	mg/l	675
F ⁻	mg/l	1.9
Cl ⁻	mg/l	71.4
NO ₂ ⁻	mg/l	<0.01
P ₂ O ₅	mg/l	<0.01
SO ₄ ⁻⁻	mg/l	1469
NO ₃ ⁻	mg/l	<0.1
NH ₄ ⁺	mg/l	26.8
Ferro disciolto	mg/l	<0.01
SiO ₂	mg/l	20.7

I soggetti sono stati studiati in tre tempi sperimentali: prima dell'inizio del trattamento idropinico (T0), dopo 15 giorni di assunzione di acqua (T1) e dopo 15 giorni dalla fine del trattamento (T2). A ciascun tempo sono stati raccolti campioni di sangue eparinizzato in apposite provette, queste sono state centrifugate a 2500 rpm per 10 min e delle aliquote di plasma sono state congelate a -80°C fino al momento dell'analisi.

Durante lo studio sono stati monitorati i seguenti parametri: specie reattive dell'ossigeno (ROM), malondialdeide (MDA), carbonili proteici e prodotti avanzati dell'ossidazione proteica (AOPP) come marcatori di stress ossidativo; tioli totali (-SH) e vitamine liposolubili (α-, β-, γ-tocoferolo, retinolo, luteina, licopene, α-, β-carotene) come antiossidanti non-enzimatici; potere biologico antiossidante (BAP) come indice della capacità antiossidante totale del plasma.

Determinazione colorimetrica dei ROM

I ROM sono stati valutati in campioni di plasma mediante l'utilizzo del "d-ROM test" (Diacron s.r.l., Grosseto) [11, 12]. In questo test, i ROM presenti a livello plasmatico (principalmente idroperossidi), in presenza di ferro generano radicali alcossilici e perossilici, in accordo con la reazione di Fenton. Questi radicali, a loro volta, sono in grado di ossidare un'ammina aromatica solubilizzata in una miscela cromogena che li trasforma così in derivati di colore rosa quantificabili spettrofotometricamente a 505 nm. L'intensità del colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione dei ROM, in accordo con la legge di Lambert-Beer's. I risultati del d-ROM test sono espressi in unità arbitrarie dette "Unità Carratelli" (CARR U), 1 CARR U corrisponde a 0.8 mg di H₂O₂/dl.

Il range di linearità del d-ROM test sta tra 50 e 500 CARR U, la variabilità intra ed inter-assay è rispettivamente del 2,1% e 3,1%. I soggetti sani presentano valori di riferimento compresi tra 250 e 300 CARR U; le condizioni di lieve, medio e alto stress ossidativo sono definite rispettivamente da valori di 320-360, 360-400 e >400 CARR U [13].

Determinazione dell' MDA

I livelli di MDA plasmatico sono stati valutati mediante cromatografia liquida a fase inversa (RP-HPLC; Jasco Corporation, Tokyo, Giappone) come descritto di seguito [14]. 50 µl di plasma sono stati derivatizzati mediante l'aggiunta di: 50 µl di idrossitoluene butilato (BHT) 0,05%, 400 µl di H₃PO₄ 0,44M e 100 µl di acido tiobarbiturico (TBA) 42 mM. Le provette sono state vortexate poi fatte bollire per 1 ora a 100°C. Una volta avvenuta la derivatizzazione i campioni sono stati riposti in ghiaccio per 5 min ed, in seguito, aggiunti 250 µl di butanolo per l'astrazione del complesso MDA-TBA. Le provette sono state nuovamente vortexate e quindi fatte centrifugare a 10000 g per separare le due fasi. Dallo strato superiore di butanolo sono stati prelevati 20 µl di campione e subito iniettati in HPLC per l'analisi. L'analisi cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Alltima C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm Milano) dotata di una pre-colonna Alltima C18 (4,6 x 7,5 mm, 5 µm). La fase eluente era costituita da una miscela di metanolo:tampone fosfato (40:60, v/v), quest'ultimo composto da KH₂PO₄ 50 mM portato a pH 6.8 con KOH 5 mM.

Il flusso era 1 ml/min. La determinazione nel visibile è stata effettuata a 532 nm, il detector a fluorescenza è stato settato alle lunghezze d'onda di 515 nm per l'eccitazione e di 553nm per l'emissione. Tutti i solventi organici utilizzati erano puri per HPLC (Carlo Erba, Milano).

Dosaggio dei carbonili

L'analisi spettrofotometrica dei carbonili plasmatici è basata sulla reazione della dinitrofenilidrazina (DNPH) con i carbonili proteici per formare idrazoni proteici [15].

La concentrazione dei carbonili è stata calcolata considerando il picco di assorbimento (355-390 nm) del campione trattato con DNPH e usando il coefficiente di estinzione molare del DNPH (22,000 M⁻¹ cm⁻¹). La concentrazione delle proteine è stata calcolata utilizzando uno standard di albumina sierica di origine bovina dissolta in guanidina idrocloride 6mM e letta a 280 nm.

Dosaggio degli AOPP

Il livello plasmatico degli AOPP è stato misurato spettrofotometricamente e calibrato mediante l'utilizzo di cloramina-T che, in presenza di potassio iodide, assorbe a 340 nm [16, 17].

La miscela di reazione è data da 200 µl di plasma diluito 1/5 in PBS e 20 µl di acido acetico, l'assorbimento è stato letto immediatamente a 340 nm, utilizzando un lettore a piastre, contro il bianco reagente contenente 200 µl di PBS.

Determinazione simultanea di tocoferoli, retinolo e carotenoidi

Il contenuto plasmatico delle vitamine antiossidanti è stato determinato mediante HPLC a fase inversa (Jasco Corporation, Tokyo, Giappone) in seguito a deproteinizzazione con etanolo ed estrazione in esano [18,19].

Dopo aver centrifugato la miscela di plasma, etanolo ed esano, lo strato organico, superiore, è stato rimosso, trasferito in altra provetta e portato a secco con azoto; il residuo è stato disciolto in 400 µl di miscela costituita da acetonitrile:tetraidrofurano:metanolo (68:22:7 v/v) e 100 µl sono stati iniettati in HPLC.

Per il saggio è stato utilizzata una colonna Alltima C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm, da Alltech, Milano) fornita di una pre-colonna Alltima C18 (4.6 x 7.5 mm, 5 µm).

La fase mobile era costituita da acetonitrile:tetraidrofurano:metanolo (68:22:7 v/v) portato a volume finale di 100 v/v con ammonio acetato 1%; il flusso era 1.5ml/min. Il detector spettrofotometrico e quello a fluorescenza sono stati programmati tenendo in considerazione le lunghezze d'onda di assorbimento (detector spettrofotometrico), eccitazione ed emissione (detector a fluorescenza) di ciascuna molecola e i rispettivi tempi di ritenzione. Tutti i solventi organici utilizzati erano puri per HPLC(Carlo Erba, Milano).

Determinazione colorimetrica dei gruppi tiolici plasmatici (-SH)

I gruppi tiolici -SH sono stati valutati nel plasma utilizzando un kit commerciale distribuito dalla Diacron s.r.l., Grosseto. Il metodo si basa sulla capacità dei gruppi -SH di reagire con l'acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

(DTNB), seguito dallo sviluppo di un complesso colorato misurabile fotometricamente a 405 nm [20]. I valori plasmatici sono compresi in un range compreso tra 400 e 600 $\mu\text{mol/l}$.

Determinazione colorimetrica del BAP

La capacità antiossidante totale dei campioni di plasma è stata valutata utilizzando il "BAP test" (Diacron s.r.l., Grosseto). Il saggio misura l'effetto combinato delle difese non-enzimatiche presenti nei fluidi biologici e può essere utile nel fornire un indice putativo dell'abilità a resistere al danno ossidativo. Il metodo misura la capacità ferro-riducente del plasma [21], ed è basato sull'abilità di una soluzione di ioni ferrici (Fe_3^+), legati ad un particolare cromogeno e quindi, colorata, di decolorarsi allorchè gli ioni Fe_3^+ sono ridotti a ioni ferrosi (Fe_2^+).

I valori delle concentrazioni sono ottenuti paragonando il cambiamento dell'assorbimento a 505 nm avvenuto nella miscela di reazione del campione con quello ottenuto per la soluzione contenente ioni ferrosi in concentrazione nota.

I cambiamenti di assorbimento sono lineari in un ampio range di concentrazione con la miscela antiossidante, compreso il plasma, e con soluzioni che contengono un antiossidante in forma pura (vitamina C).

I coefficienti di variazione intra e inter-assay sono inferiori al 5.5%. Il potere antiossidante plasmatico viene espresso in $^{\circ}\text{mol/l}$ di vitamina C; i valori normali ottenuti per i soggetti sani, approssimativamente, sono di 2200 $^{\circ}\text{mol/l}$ di vitamina C.

Analisi statistica ed elaborazione dei dati

I risultati sono espressi come media \pm errore standard.

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test Wilcoxon e sono stati accettati i valori di probabilità <0.05 . Le analisi statistiche e i grafici sono stati ottenuti utilizzando il software Microcal™ Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, Ma, USA).

RISULTATI

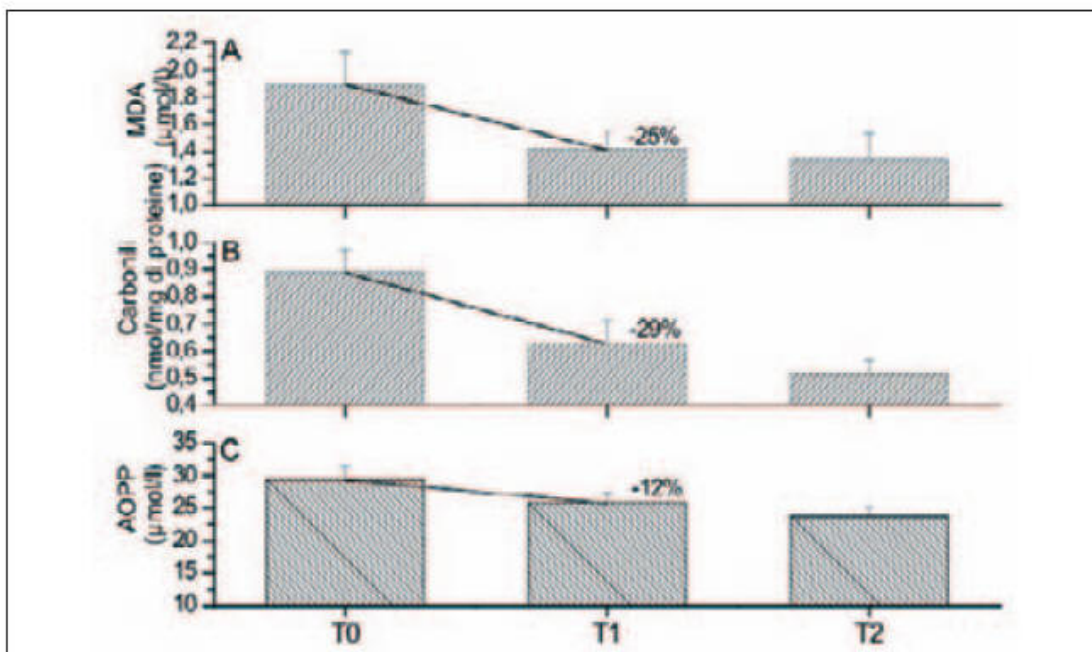
Marcatori di stress ossidativo

Dopo 15 giorni di trattamento idropinico con acqua sulfurea, non sono stati osservati particolari cambiamenti nei livelli di idroperossidi plasmatici; infatti, i livelli dei ROM sono comparabili sia prima (T0) che dopo (T1) il trattamento (301 ± 8 e 298 ± 9 CARR U, rispettivamente), i valori rientrano nel range di riferimento (250-320 CARR U).

Al contrario, è stato osservato, dopo il trattamento idropinico, un significativo decremento dei marcatori di danno ossidativo, come rappresentato in **Figura 1**. Più in dettaglio, i livelli di MDA plasmatico si abbassano passando da 1.89 ± 0.25 (T0) a 1.41 ± 0.14 e 1.34 ± 0.19 $\mu\text{mol/l}$ (rispettivamente T1 e T2, $p < 0.05$ vs. T0) (**Figura 1A**); allo stesso tempo la concentrazione dei carbonili varia da 0.89 ± 0.09 (T0) a 0.63 ± 0.08 e 0.52 ± 0.05 nmol/mg di proteine ($p < 0.05$ T1 vs. T0; $p < 0.01$ T2 vs. T0) (**Figura 1B**), mentre quella degli AOPP da 29.4 ± 2.0 (T0) a 25.8 ± 1.5 e 23.8 ± 1.4 $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0.05$ T1 vs. T0; $p < 0.01$ T2 vs. T0) (**Figura 1C**).

Figura 1

Marcatori di stress ossidativo in soggetti trattati con acqua sulfurea. A) Decremento dei livelli di MDA plasmatica a T1 e T2 ($p < 0.05$ vs. T0). B) Decremento dei livelli di carbonili plasmatici a T1 e T2 ($p < 0.05$ T1 vs. T0; $p < 0.01$ T2 vs. T0). C) Decremento dei livelli plasmatici di AOPP a T1 e T2 ($p < 0.05$ T1 vs. T0; $p < 0.01$ T2 vs. T0)



Stato antiossidante

La **Tabella 2** mostra il profilo antiossidante dei soggetti prima del trattamento idropinico (T0). Non si osservano condizioni di carenze vitaminiche e i valori della capacità antiossidante totale del plasma sono paragonabili a quelli di riferimento (2200 $\mu\text{mol/l}$ di vitamina C).

Tabella 2

profilo antiossidante dei soggetti coinvolti nello studio prima del trattamento idropinico (T0)

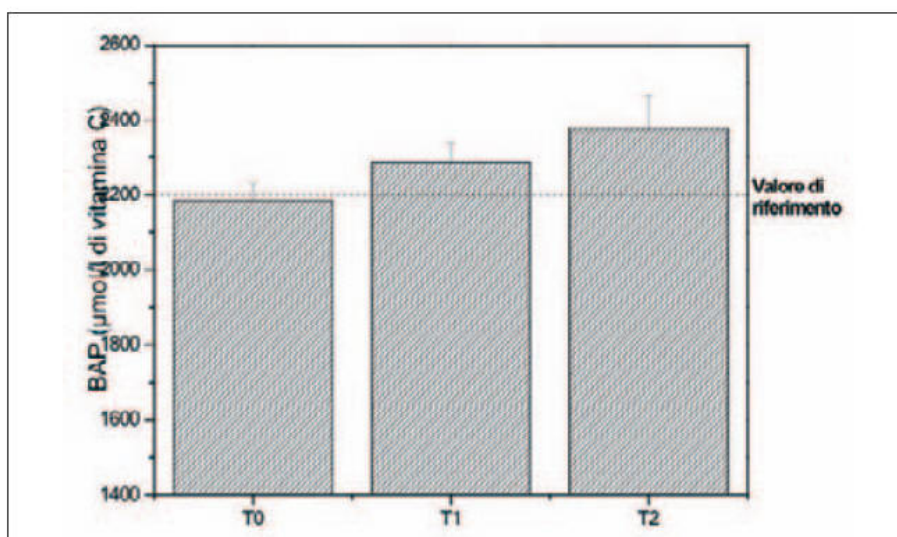
BAP ($\mu\text{mol/l}$ vit C)	2184 \pm 49*
Gruppi -SH ($\mu\text{mol/l}$)	546 \pm 11
Retinolo ($\mu\text{mol/l}$)	3,5
α -Tocoferolo ($\mu\text{mol/l}$)	23,7
δ - Tocoferolo ($\mu\text{mol/l}$)	0,09
γ - Tocoferolo ($\mu\text{mol/l}$)	0,49
Luteina ($\mu\text{mol/l}$)	0,38
Licopene ($\mu\text{mol/l}$)	0,95
α - Carotene ($\mu\text{mol/l}$)	0,08
β - Carotene ($\mu\text{mol/l}$)	0,43

* Il valore di riferimento del BAP nei soggetti sani è 2200 $\mu\text{mol/l}$ di vitamina C

È interessante notare come il trattamento idropinico porti ad un aumento del potere antiossidante del plasma e i valori ottenuti dal BAP test aumentano significativamente da 2184 \pm 49 (T0) a 2284 \pm 55 e 2377 \pm 88 $\mu\text{mol/l}$ di vitamina C (rispettivamente T1 e T2, $p < 0.05$ vs. T0) come dimostra la **Figura 2**.

Figura 2

Potere biologico antiossidante (BAP) di campioni di plasma come indice della capacità antiossidante totale. A T1 e T2 si osserva un significativo aumento del BAP ($p < 0.05$ vs. T0)



Per quanto riguarda le difese antiossidanti nonenzimatiche non si sono osservati significativi cambiamenti delle loro concentrazioni plasmatiche nei tre differenti tempi sperimentali; infatti, ai tempi T1 e T2 sia i livelli dei gruppi tiolici -SH che quelli delle vitamine liposolubili (carotenoidi, tocoferoli e retinolo) sono paragonabili a quelli valutati al tempo T0 (**Tabella 2**).

DISCUSSIONI

L'importanza dello zolfo è risaputa, esso interviene nella biosintesi di importanti cofattori vitali e di biomolecole ed è coinvolto in complessi meccanismi di reazione quali la solfatazione delle glicoproteine nel tratto gastrintestinale, oppure del galactosil-ceramide per formare un solfatide necessario per la formazione della mielina.

Spesso, la solfatazione è un passaggio chiave nella detossificazione o nel processo di escrezione di metaboliti tossici o in eccesso [22].

Questi aspetti possono avere una rilevanza clinica per l'interpretazione degli effetti benefici evidenziati durante i trattamenti a base di acqua sulfurea.

I meccanismi di azione dello zolfo, coinvolti nello stress ossidativo, contenuto nelle acque termali (sotto forma di solfuro di idrogeno H₂S) sono meno conosciuti.

Per esaminare meglio questo aspetto, abbiamo studiato l'effetto della somministrazione di acqua sulfurea (500 ml assunti giornalmente per 15 giorni) su alcuni parametri biochimici di stress ossidativo e sul profilo antiossidante di soggetti sani.

Il sistema di difesa antiossidante è caratterizzato da una complessa rete di interazioni, sinergismi, e specifiche funzioni per ogni molecola antiossidante, per questo motivo la valutazione del potere antiossidante del plasma non può essere considerata un'alternativa

alla determinazione dello stato di ogni singolo antiossidante, comunque può essere utile per valutare lo stress ossidativo in condizioni normali (fisiologiche).

Il risultato che evidenzia l'aumento della capacità antiossidante del plasma, dopo trattamento idropinico, è particolarmente interessante per mettere in risalto il ruolo dell'acqua sulfurea nello sviluppo delle difese antiossidanti. Infatti, in concomitanza con un significativo incremento dei valori del BAP, è stato dimostrato un significativo decremento dei marcatori di ossidazione lipica e proteica dopo 15 giorni di trattamento (T1).

È interessante far notare che questi effetti benefici si osservano anche 15 giorni dopo la fine del trattamento (T2), indicando così, un persistente ruolo protettivo dell'acqua sulfurea anche nel breve periodo che segue l'interruzione del trattamento.

Alla luce di questi risultati si può affermare che sarebbero sicuramente raccomandati dei trattamenti termali ciclici per preservare a lungo l'azione antiossidante delle acque sulfuree.

In conclusione, i nostri dati, che hanno evidenziato un miglioramento dello stato redox del corpo, confermano i benefici dell'acqua sulfurea che può ridurre il rischio di malattie degenerative e collegate all'invecchiamento, nelle quali il livello di stress ossidativo può giocare un ruolo fondamentale nella loro patogenesi.

Ringraziamenti

Un ringraziamento particolare va a Francesca Baldon (Terme di Saturnia) per l'assistenza tecnica.

BIBLIOGRAFIA

1. Sachidanandam K., Fagan SC, Ergul A.: Oxidative stress and cardiovascular disease: antioxidants and unresolved issues. *Cardiovasc Drug Rev* 2005;23:115-132
2. Casetta I., Govoni V., Granieri E.: Oxidative stress, antioxidants and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des* 2005;11:2033-2052
3. Aslan M, Ozben T.: Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2004;1:111-119
4. Taylor D., Williams D.R.: Trace Element Medicine and Chelation Therapy. The Royal Society of Chemistry Paperbacks, 1995
5. Beinert H.: A tribute to sulfur. *Eur J. Biochem* 2000;267: 5657-5664
6. Sukenik S., Buskila D., Neumann L., Kleiner-Baumgarten A., Zimlichman S., Horowitz J.: Sulphur bath and mud pack treatment for rheumatoid arthritis at the Dead Sea area. *Ann Rheum Dis* 1990;49:99-102
7. Leibetseder V., Strauss-Blasche G., Holzer F., Marktl W., Ekmekcioglu C.: Improving homocysteine levels through balneotherapy: effects of sulphur baths. *Clin Chim Acta* 2004;343:105-111
8. Albertini M.C., Sammartino V., Canestrari F., Baldoni F., Galli F., Rovidati S., Dachà M.: Effets anti-oxydants du traitement hydromineral avec une eau sulfurée chez le lapin. *Presse Thermale et Climatique* 1996;133:124-127
9. Albertini M.C., Canestrari F., Sammartino V., Rovidati S., Galli F., Dachà M.: Rat abrevé d'eau sulfurée: évaluation du stress oxydatif. *Presse Thermale et Climatique* 1999;136:31-35
10. Albertini M.C., Canestrari F., Sammartino V., Rovidati S., Galli F., Ghiandoni G., Rocchi M.B.L., Dachà M.: Traitement hydromineral avec une eau sulfurée chez l'homme. *Presse Thermale et Climatique* 1999;136:36-42
11. Cesarone M.R., Belcaro G., Caratelli M., Cornelli U., De Sanctis M.T., Incandela L, Barsotti A, Terranova R, Nicolaidis: A simple test to monitor oxidative stress. *Int Angiol* 1999; 18:127-130
12. Trotti R., Caratelli M., Barbieri M.: Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Med* 2002;44:37-40

13. Trotti R., Caratelli M., Barbieri M., Micieli G., Bosone D., Rondanelli M., Bo P.: Oxidative stress and a thrombophilic condition in alcoholics without severe liver disease. *Haematologica* 2001; 86: 85-91
14. Agarwal R., Chase S.D.: Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Appl* 2002; 775: 121-126
15. Abraham Z., Resnik, Packer L.: Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357-363
16. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillere-Blandin C., Nguyen-Koa T., Nguyen A.T., Zingraff J., Jungers P., Descamps-Latscha B.: Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304-1313
17. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillere-Blandin C., Nguyen-Koa T., Nguyen A.T., Jungers P., Canteloup S., Dayer J.M., Druke T., Descamps-Latscha B.: Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-2532
18. Aebischer C.P., Schierle J., Schuep W.: Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotene, lycopene and xanthophylls in plasma by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 1999; 299: 348-362
19. Bui M.H.: Simple determination of retinol, alpha-tocopherol and carotenoids (lutein, all-trans-lycopene, alpha- and beta-carotenes) in human plasma by isocratic liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994; 654: 129-133
20. Hu M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione. *Methods Enzymol* 1994; 233: 380-385
21. Benzie I.F., Strain J.J.: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76
22. Mulder G.J., Jakoby W.B. Sulfation; in Mulder G.J. (ed): *Conjugation Reactions in Drug Metabolism*. Taylor and Francis, London, 1990, pp 107-16