

Effetti di un fermentato di grano (Lisosan g) sulla salute della retina

I processi di fermentazione nel frumento permettono un aumento del suo profilo fenolico e delle capacità antiossidanti, rendendo i prodotti che ne derivano potenzialmente utili nel trattamento di diversi disturbi. Tra gli studi che riguardano diverse patologie oculari, emerge appunto che l'utilizzo di molecole antiossidanti può rappresentare una prospettiva terapeutica degna di particolare interesse.

*Clara Maria Della Croce, *Vincenzo Longo, **Rosario Amato, **Maria Grazia Rossino, *Laura Pucci

a tecnica di fermentazione dei cereali viene impiegata da moltissimi anni ed è stato dimostrato in diversi lavori che influenza la qualità di un alimento migliorandone la digeribilità, la conservazione e le proprietà nutraceutiche. Questo processo infatti è in grado di incrementare la concentrazione di polifenoli e di altre molecole antiossidanti: in particolare è stato evidenziato che l'attività di idrolisi della componente microbica, durante il processo fermentativo, da una parte provoca il rilascio dei fenoli legati rendendoli più accessibili all'assorbimento e dall'altra porta alla sintesi di nuovi composti bioattivi (1-5). È stato osservato che il processo di fermentazione in prodotti come soia, crusca di segale, miglio e segale integrale porta a un rilascio significativo di acidi fenolici (6,7). Uno studio recente ha analizzato l'azione dei processi fermentativi sui profili fenolici e sulle attività antiossidanti di quattro diverse varietà di grano duro invernale rosso. La fermentazione ha incrementato la concentrazione di acidi fenolici solubili, il contenuto di flavonoidi e le attività antiossidanti. Inoltre, è stato dimostrato che il processo di fermentazione causa la diminuzione dell'acido siringico mentre aumenta in maniera significativa i valori degli acidi vanillico e ferulico, i quali sono riconosciuti per le loro importanti proprietà biologiche (8).

Antiossidanti e salute dell'occhio

L'occhio, a causa della sua particolare struttura anatomica e considerando il suo continuo contatto con l'ambiente esterno (luce, ossigeno, sostanze irritanti) è sicuramente sottoposto a condizioni di stress ossidativo. In particolare, la cataratta, la degenerazione maculare senile, la retinopatia diabetica e il glaucoma sono tra le patologie maggiormente associate alla formazione di radicali liberi e allo stress ossidativo. Tra gli studi che riguardano diverse patologie oculari, emerge che l'utilizzo di molecole antiossidanti può rappresentare una prospettiva terapeutica degna di particolare interesse. Una sana alimentazione è una buona fonte di antiossidanti; per questo motivo, già da diversi anni è stato studiato, attraverso sistemi biologici sia in vitro che in vivo. l'effetto di componenti alimentari sulla salute dell'occhio e i risultati emersi sono stati positivi (9,10).

Lisosan G: un fermentato di grano biologico

Il Lisosan G è un fermentato di grano biologico (*Triticum aestivum*), registrato presso il Ministero della Salute Italiano come integratore alimentare, prodotto e commercializzato da Agrisan SRL (Larciano, PT). Tale composto è ricco di vitamine del gruppo B, tocoferoli, antiossidanti, oligoelementi e acidi grassi polinsaturi (acido linoleico e acido linolenico).

Nel processo di produzione, il grano intero viene prima macinato e successivamente viene aggiunta acqua per inumidire l'impasto; attraverso la pasta madre, costituita principalmente da una miscela di lattobacilli e ceppi di lievito naturale, si avvia la fermentazione. Una volta che il prodotto è fermentato, raggiungendo un pH acido, viene essiccato. La polvere secca risultante

è il Lisosan G, ampiamente utilizzato nella produzione alimentare grazie al suo ricco contenuto nutrizionale. A oggi, diversi studi sono stati pubblicati sugli aspetti salutistici di questo lisato e, in particolare, sui suoi effetti antiossidanti e antinfiammatori (11-14). Per esempio, è stato dimostrato che Lisosan G aiuta a prevenire disfunzioni a carico di cellule endoteliali (15), mentre un lavoro su colture di epatociti primari di ratto ha evidenziato che modula negativamente NF-kB, un fattore di trascrizione coinvolto nell'attivazione della risposta infiammatoria. Inoltre, l'integratore è in grado di svolgere un'azione antiossidante inducendo l'attivazione di Nrf2, fattore chiave per l'espressione di molti enzimi coinvolti nella riduzione dello stress ossidativo (16-21).

È bene sottolineare che il pro-

dotto è disponibile in polvere e in forma liquida (Lisosan G e Lisosan ACQUA G, quest'ultima ottenuta dal processo di asciugatura dopo il processo di fermentazione) e può essere assunto da solo o in combinazione con altri prodotti alimentari come pane e pasta (22).

Lisosan G e malattie della retina

Recentemente, presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa è stato condotto un lavoro in cui è stato studiato l'effetto del Lisosan G sulla salute della retina in condizioni di stress. In particolare, la sua azione antiossidante è stata valutata utilizzando un modello *ex vivo* di stress ossidativo, rappresentato da espianti retinici in coltura, e un modello *in vivo* di retinopatia diabetica, rappresentato da ratti diabetici.

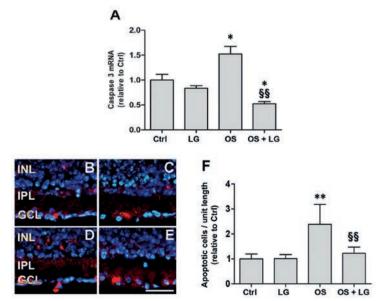


Figura 1, tratta da: Amato et al. 2018, Nutrients 10, 1932: Espressione dell'mRNA della caspasi-3 (A), determinata con qPCR in espianti di retina ex vivo in condizioni di controllo (Ctrl), in presenza di Lisosan G da solo (LG), in presenza di solo stress ossidativo (OS), oppure in presenza di stress ossidativo con Lisosan G (OS+LG). Immunofluorescenza per la caspasi-3 attiva (colore rosso) in sezioni di espianti retinici di controllo (B), trattati con solo Lisosan G (C), trattati con solo stress ossidativo (D) o trattati con stress ossidativo in presenza di Lisosan G (E) i nuclei delle cellule retiniche sono controcolorati in blu. GCL, strato delle cellule ganglionari, INL, strato nucleare interno, IPL, strato plessiforme interno. Calibrazione, 50 Qm. Analisi quantitativa (F) del numero di cellule immunomarate per la caspasi-3 attiva. Nei grafici, ogni colonna rappresenta media 3 DS. *p < 0,05 rispetto a Ctrl; § p < 0,05 rispetto a OS; §§ p < 0,01 rispetto a OS; n = 3.

Studi in un modello ex vivo

Per preparare gli espianti ex vivo, le retine sono state dissezionate e tagliate in frammenti. La condizione di stress ossidativo è stata indotta aggiungendo H_2O_2 al terreno di coltura. Per valutare l'effetto del Lisosan G, quest'ultimo è stato aggiunto al terreno di coltura in due diverse concentrazioni.

Azioni neuroprotettive

L'esperimento ha avuto una durata di cinque giorni, alla fine dei quali sono state condotte alcune analisi molecolari per valutare l'effetto del trattamento sulla morte dei neuroni retinici quantificando l'espressione della caspasi-3, uno dei principali enzimi coinvolti nel processo di morte cellulare per apoptosi. (23). Come è evidente dalla figura 1A,

lo stress ossidativo induce l'espressione di caspasi-3, valutata con il metodo della reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR). Il trattamento con solo Lisosan G non ha indotto alcun cambiamento, confermando che la somministrazione del composto agli espianti non induce effetti collaterali indesiderati, mentre il trattamento di espianti sottoposti a stress ossidativo in presenza di Lisosan G ha riportato i valori a livello del controllo. Tale risultato è stato confermato in esperimenti di immunofluorescenza per visualizzare le cellule apoptotiche caratterizzate dall'espressione della forma attiva della caspasi-3. Come evidenziato dalla figura 2 (riquadri B - E), infatti, le cellule marcate con anticorpi diretti contro la caspasi-3 attivata sono

maggiormente presenti negli espianti sottoposti a stress ossidativo. L'analisi quantitativa del numero di cellule immunomarcate (figura 1F) conferma che il trattamento con Lisosan G ripristina le condizioni del controllo.

Il trattamento con stress ossidativo induce anche un aumento di espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), che provoca disfunzioni vascolari come aumento della permeabilità vascolare e crescita abnorme di nuovi vasi sanguigni. Anche in questo caso, il trattamento con Lisosan G previene l'incontrollato aumento di espressione di tale fattore di crescita e fa sì che vengano mantenuti i valori di VEGF tipici della condizione normale (controllo, figura 2).

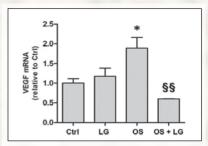




Scegli il Natale che rende tutti felici: i dolci **Probios 100% biologici** sono disponibili in versione tradizionale, **senza glutine**, **vegan** e **senza zuccheri.**Per augurare Buon Natale proprio a tutti

WWW.PROBIOS.IT
SEGUICI SU 1 D 0 D 1

Figura 2, tratta da: Amato et al. 2018, Nutrients 10, 1932. Espres-sione dell'mR-NA del VEGF, determinata con aPCR in espianti di retina ex vivo in condizioni di controllo (Ctrl), in presenza di Lisosan G da solo (LG), in presenza di solo stress ossidativo (OS), oppure in presenza di stress ossidativo con Lisosan G (OS+LG). Ogni colonna rappresenta media 3 DS. *p < 0,05 rispetto a Ctrl; §§ p < 0,01 rispetto a OS; n = 3.



Azioni antiossidanti

Per dimostrare se ali effetti di Lisosan G potessero essere attribuiti alle sue proprietà antiossidanti e per determinare quando il trattamento con l'integratore inizia a essere efficace, è stata quantificata l'espressione di un marcatore di stress ossidativo, quale eme ossigenasi-1 (HO-1), dopo 6 o 12 ore di incubazione con o senza Lisosan G (figura 3). I risultati ottenuti evidenziano che dopo 12 ore l'espressione del mRNA di HO-1 aumenta significativamente in espianti sottoposti a stress, mentre sono ridotti in seguito a trattamento con Lisosan G.

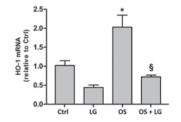


Figura 3, tratta da: Amato et al. 2018, Nutrients 10, 1932. Espressione dell'mR-NA di HO-1 determinata con qPCE in nespianti di retina ex vivo in condizioni di controllo (Ctrl), in presenza di Lisosan G da solo (LG), in presenza di solo stress ossidativo (OS), oppure in presenza di stress ossidativo con Lisosan G (OS+LG). Ogni colonna rappresenta media 3 DS. *p < 0,05 rispetto a Ctrl; § p < 0,05 rispetto a OS; n = 3.

In sintesi, i dati ottenuti con il modello *ex vivo* hanno messo in luce una significativa capacità neuroprotettiva del Lisosan G a livello retinico, dovuta alle sue proprietà antiossidanti.

Studi in un modello in vivo di retinopatia diabetica

Un modello *in vivo* di retinopa-

tia diabetica si può ottenere inducendo il diabete in ratti tramite iniezioni intraperitoneali di streptozotocina, una tossina specifica per le cellule beta del pancreas. I ratti diabetici sono stati trattati giornalmente con Lisosan G somministrato tramite una sonda gastrica. Dopo cinque settimane dall'induzione del diabete, sono state eseguite analisi per valutare la funzionalità della retina, la morte di cellule retiniche, la permeabilità vascolare e la risposta antiossidante.

Lisosan G e funzionalità della retina

La funzione retinica è stata esaminata utilizzando la tecnica dell'elettroretinogramma, che consiste nella registrazione dell'attività retinica in risposta a uno stimolo luminoso ottenuta tramite elettrodi applicati sulla superficie oculare. Come mostrato in figura 4, i risultati suggeriscono che Lisosan G è in grado di prevenire l'evidente

peggioramento della funzione retinica causato dal diabete.

Lisosan G e attivazione delle difese antiossidanti

Attraverso analisi di immunofluorescenza è stata valutata la presenza di Nrf2, un fattore che svolge un ruolo centrale nella difesa contro lo stress ossidativo nelle cellule. In particolare, Nrf2 è attivato in risposta a un aumento di concentrazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed è un fattore di trascrizione sensibile all'ossidoriduzione. In risposta all'aumento di ROS, Nrf2 trasloca dal citosol al nucleo cellulare e si lega a un promotore sul DNA attivando la trascrizione di geni che codificano enzimi antiossidanti come per esempio superossido dismutasi, catalasi e HO-1 (24-26). Nella figura 5, le immagini di immunofluorescenza, ottenute utilizzando anticorpi diretti contro Nrf2, mostrano la localizzazione di questo fattore di trascrizione

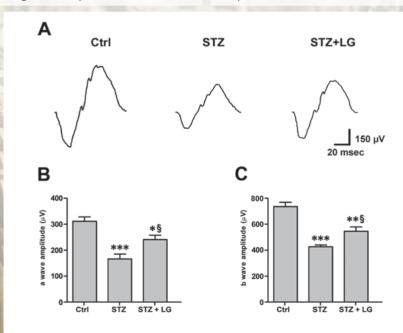
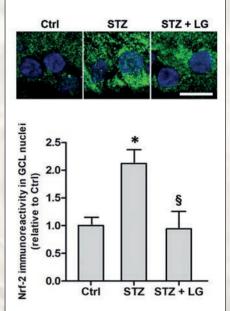


Figura 4, tratta da: Amato et al. 2018, Nutrients 10, 1932. Analisi della funzione retinica tramite elettroretinogramma. Tipico tracciati elettroretinografici (A) si compongono di due onde, la "a" e la "b" le cui ampiezze sono riportate, rispettivamente in (B) e in (C). STZ: streptozotocina (indica i ratti diabetici). Ogni colonna rappresenta media 3 DS. "p < 0,05 rispetto a Ctrl; ** p < 0,001 rispetto a Ctrl; \$ p < 0,05 rispetto a STZ. n = 5

Figura 5, tratta da: Amato et al. 2018, Nutrients 10, 1932. Immunofluorescenza ottenuta con anticorpi diretti contro Nrf2 (in verde) in sezioni di retine controcolorate con un marcatore dei nuclei cellulari (in blu) e analisi quantitativa dei livelli di immunofluorescenza. STZ: streptozotocina (indica i ratti diabetici). Calibrazione, 10 Qm. Ogni colonna rappresenta media 3 DS. *p < 0,05 rispetto a Ctrl; § p < 0,05 rispetto a STZ; n = 4



a livello dello strato retinico delle cellule ganglionari. In ratti non trattati (controlli), Nrf2 appare diffusamente presente nel citoplasma delle cellule, mentre nei ratti diabetici esso appare maggiormente espresso, ma soprattutto è presente in elevate quantità nel nucleo di gueste cellule, indicando che la condizione diabetica ha indotto la traslocazione nucleare di Nrf2 e, presumibilmente, l'espressione degli enzimi antiossidanti in risposta a una condizione di stress ossidativo. Il trattamento con Lisosan G, invece, ripristina nell'animale diabetico una condizione simile a quella dei controlli.

Lisosan G e modificazioni di vasi sanguigni

Una caratteristica peculiare delle fasi precoci della retinopatia diabetica è costituita da danni riscontrabili a livello dei capillari sanguigni che irrorano la retina. In particolare, è noto che c'è una ridotta efficienza della barriera emato-retinica, una barriera costituita principalmente dalle cellule endoteliali dei vasi e dalle cellule gliali di Müller che protegge i neuroni da eventuali

effetti tossici di sostanze portate dal sangue (27,28). Per valutare lo stato di permeabilità dei vasi, come indice della consistenza della barriera emato-retinica, i ratti sono stati anestetizzati e colorante blu di Evans (rileva-

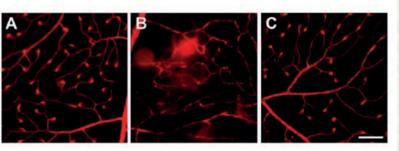


Figura 6, tratta da: Amato et al. 2018, Nutrients 10, 1932. Vasi retinici in retine intere visualizzati tramite fluorescenza del colorante blu di Evans in ratti non diabetici di controllo (A), in ratti diabetici (B) e in ratti diabetici trattati con Lisosan G (C).









Prodotto e distribuito da: A.V.D. Reform Srl Via Enrico Fermi 6, Noceto (PR) tel. 0521 628498



www.avdreform.it



bile grazie alla sua fluorescenza rossa) è stato infuso nella loro circolazione sanguigna. Quindi, le retine sono state dissezionate ed esaminate con un microscopio a fluorescenza. Come mostrato nella figura 6, è evidente un aumento della permeabilità dei vasi retinici nei ratti diabetici, il che indica un sensibile danno alla barriera emato-retinica. Questo danno sembra essere quasi completamente prevenuto dalla somministrazione di Lisosan G.

Conclusione

In conclusione, i risultati ottenuti in questi studi mostrano che il Lisosan G è molto efficace nel proteggere la retina dai danni indotti dal diabete. La sua azione prevalente sembra esplicarsi attraverso le sue potenti proprietà antiossidanti. Il risultato della somministrazione dell'integratore in termini di protezione dei neuroni retinici dalla morte per apoptosi si traduce anche, e soprattutto, in un considerevole miglioramento della funzione vi-

siva. Su queste basi, è possibile immaginare un suo impiego nel trattamento a lungo termine della retinopatia diabetica. Inoltre, dal momento che lo stress ossidativo è un fattore patogenetico comune a diverse patologie retiniche, il Lisosan G potrebbe rappresentare un promettente prodotto nutraceutico per il trattamento di diverse malattie che colpiscono la retina.

* Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria - CNR Pisa

** UNIVERSITÀ DI PISA, Dipartimento di Biologia

Bibliografia

ordevic TM, Šiler-Marinkovic SS, Dimitrijevic-Brankovic SI (2010) Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chem* 119(3):957-963.

Martins S, Mussatto SI, Martínez-Avila G, Montañez-Saenz J, Aguilar CN, Teixeira JA (2011) Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol Adv* 29(3):365-373.

Hur SJ, Lee SY, Kim YC, Choi I, Kim GB (2014) Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem* 160: 346-356.

Dey TB, Kuhad RC (2014) Enhanced

Production and Extraction of Phenolic Compounds from Wheat by Solid-State Fermentation with Rhizopus Oryzae RCK2012. *Biotechnol Rep* 4: 120-127.

Balli D, Bellumori M, Paoli P, Pieraccini G, Di Paola M, De Filippo C, Di Gioia D, Mulinacci N, Innocenti M (2019) Study on a fermented whole wheat: phenolic content, activity on PTP1B enzyme and in vitro prebiotic properties. *Molecules* 24:1120.

Gan RY, Shah NP, Wang MF,Lui WY Corke H (2016) Fermentation alters antioxidant capacity and polyphenol distribution in selected edible legumes. *Int J Food Sci Tech* 51, 875-884.

Peng M, Liu JY, Huang Y, Zhou M, Hu Y, Fu C, Dai J, Wang C, Li D, Gao B, Xu N (2017) Effects of a mixed koji culture of Aspergillus oryzae HG-26 and Aspergillus niger HG-35 on the levels of enzymes, antioxidants and phenolic compounds in soy sauce during the fermentation process. Int J Food Sci Tech 52, 1585-1593

Tian W, Chen G, Tilley M, Li Y (2021) Changes in phenolic profiles and antioxidant activities during the whole wheat bread-making process. *Food Chem* 345:128851.

Lawrenson JG, Downie LE (2019) Nutrition and Eye Health. *Nutrients* 11(9):2123. Weikel KA, Garber C, Baburins A, Taylor A (2014) Nutritional modulation of cataract. *Nutr Rev* 72:30–47

Longo V, Caltavuturo L, Ciardi M, Della Croce CM (2011 a) Effetti fisiologici di un lisato di grano. *Natural 1* 108, 48-53. Frassinetti S, Della Croce CM, Caltavuturo L, Longo V (2012) Antimutagenic and antioxidant activity of Lisosan G in Saccharomyces cerevisiae. *Food Chem* 135: 2029-2034.

Longo V, Chirulli V, Gervasi PG, Nencioni S, Pellegrini M (2007) Lisosan G, a powder of grain, does not interfere with the drug metabolizing enzymes and has a protective role on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biotechnol lett* 29: 1155–1159.

Longo V, Gervasi PG, Lubrano V (2011 b) Cisplatin induced toxicity in rat tissues: the protective effect of Lisosan G. *Food Chem Toxicol* 49: 233-237.

Lubrano V, Baldi S, Napoli D, Longo V (2012) Beneficial effect of Lisosan G on cultured human microvascular endothelial cells exposed to oxidised low density lipoprotein. *Indian J Med Res* 136: 82–88.

La Marca M, Beffy P, Pugliese A, Longo V (2013) Fermented wheat powder induces the antioxidant and detoxifying system in primary rat hepatocytes. *PLoS One* 8(12):e83538.

Lucchesi D, Russo R, Gabriele M, Longo

V, Del Prato S, Penno G, Pucci L (2014) Grain and bean lysates improve function of endothelial progenitor cells from human peripheral blood: involvement of the endogenous antioxidant defenses. *PLoS One* 9(10):e109298.

Amato R, Rossino MG, Cammalleri M, Locri F, Pucci L, Dal Monte M, Casini G (2018) Lisosan G protects the retina from neurovascular damage in experimental diabetic retinopathy. *Nutrients* 10:1932.

Amato R, Rossino MG, Cammalleri M, Timperio AM, Fanelli G, Dal Monte M, Pucci L, Giovanni Casini G (2021) The potential of Lisosan G as a possible treatment for glaucoma. *Front Pharmacol* 28(12)719951.

Rossino MG, Casini G (2019) Nutraceuticals for the treatment of diabetic Retinopathy *Nutrients* 11(4):771.

Rossino MG, Lulli M, Amato R, Cammalleri M, Monte MD, Casini G. (2020) Oxidative stress induces a VEGF autocrine loop in the retina: relevance for diabetic retinopathy. *Cells* 9(6):1452.

Longo V, Quintieri L, Caputo L, Pozzo L (2020) fermentazione del grano con pasta madre *Natural 1 198:* 15-21.

Tian M, Liu S, Liu L, Zhang EK, Wang HW, Deng Y, Yue YK (2019) Correlations of the severity of diabetic retinopathy with EPO, Caspase-3 expression and oxidative stress *Eur Rev Med Pharmacol* Sci 23 (22): 9707-9713

Hybertson BM, Gao B, Swapan K Bose, McCord Joe M (2011) Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med* 32(4-6):234-246.

Ma Q (2013) Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 53: 401–426.

Bellezza I, Giambanco I ,Minelli A , Donato R (2018) Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *BBA - Mol Cell Res* 1865 (5)721-733.

Shin E S, Sorenson C M, Sheibani N (2014). Diabetes and retinal vascular dysfunction. *J Ophthalmic Vis Res* 9(3), 362.

Semeraro F, Cancarini A, Rezzola S, Romano MR, Costagliola, C (2015). Diabetic retinopathy: vascular and inflammatory disease. *J Diabetes Res.* doi: 10.1155/2015/582060

