

# Effetti benefici dell'acqua minerale con contenuto elettrolitico simile a quello umano in un modello pre-clinico di infiammazione vascolare

Nutrition and Healthy Aging  
Volume 9: 169–178  
© The Author(s) 2024  
Article reuse guidelines:  
[sagepub.com/journals-permissions](https://sagepub.com/journals-permissions)  
DOI: 10.1177/24519502241305503  
[journals.sagepub.com/home/nut](https://journals.sagepub.com/home/nut)  
 | 

Laura Benvenuti<sup>1,\*</sup>, Vanessa D'Antongiovanni<sup>1,\*</sup>, Clelia Di Salvo<sup>1</sup> , Giulia Valdiserra<sup>1</sup>, Stefano Masi<sup>1</sup>, Alessandro Mengozzi<sup>1</sup>, Emiliano Duranti<sup>1</sup>, Carolina Pellegrini<sup>1,\*</sup>, Matteo Fornai<sup>1</sup>, and Luca Antonioli<sup>1</sup>

## Riassunto

**Premessa:** Il termine “inflammaging” è stato introdotto per descrivere il processo infiammatorio cronico, di basso grado, associato all'aumento dell'età e alla senescenza del sistema immunitario, che conferisce suscettibilità a soffrire di patologie legate all'invecchiamento. In questo contesto, studi precedenti hanno già dimostrato che il consumo regolare di acqua minerale può essere un valido strumento per disintossicare l'organismo dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e per attenuare l'infiammazione sistemica.

**Obiettivo:** in questo studio abbiamo testato gli effetti benefici di un'acqua minerale con un contenuto elettrolitico simile a quello del plasma umano (acqua San Carlo®) in un modello preclinico di infiammazione vascolare e abbiamo studiato i meccanismi alla base di questo effetto. L'acqua San Carlo® è stata somministrata ad libitum a ratti giovani (10 settimane) e anziani (40 settimane) per 3 mesi.

**Metodi:** sono stati valutati la funzionalità vascolare, lo stress ossidativo (dosaggio del colorante fluorescente diidroetidio, livelli di MDA e livelli di 8-isoprostani nelle urine) e l'infiammazione sistemica (livelli di IL-1 $\beta$  e TNF).

**Risultati:** L'ingestione di acqua San Carlo® ha attenuato l'infiammazione riducendo i livelli plasmatici di TNF e ha migliorato la vasorelazione endotelio-dipendente, agendo contro la produzione di ROS.

**Conclusioni:** Il presente studio suggerisce che l'uso dell'acqua San Carlo® può contrastare efficacemente l'infiammazione di basso grado tipicamente associata all'età e alla relativa disfunzione vascolare, probabilmente attraverso proprietà antiossidanti e antinfiammatorie.

## Parole chiave

invecchiamento, antiossidante, acqua minerale, inflammaging, infiammazione

Ricevuto: 24 gennaio 2024; rivisto: 17 settembre 2024; accettato: 16 ottobre 2024

## Introduzione

All'inizio degli anni 2000, è stato introdotto il termine “inflammaging” per descrivere il processo infiammatorio cronico, sterile e di basso grado che si sviluppa con l'età, che conferisce suscettibilità a patologie legate all'età e che facilita la diffusione dell'effetto dell'invecchiamento a livello sistemico. <sup>1</sup>Durante l'invecchiamento, la maggior parte delle cellule del nostro corpo subisce il processo di senescenza, caratterizzato dall'acquisizione di uno stato disfunzionale e di un fenotipo secretorio associato alla senescenza.

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa, Pisa, Italia

\*Questi autori hanno contribuito in egual misura alla stesura del manoscritto.

### Autore corrispondente:

Luca Antonioli, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Unità di Farmacologia e Farmacovigilanza, Università di Pisa, Via Roma 55, Pisa 56126, Italia.

Email: [luca.antonioli@unipi.it](mailto:luca.antonioli@unipi.it)



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: Questo articolo è distribuito secondo i termini della Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) che consente l'uso non commerciale, la riproduzione e la distribuzione dell'opera senza ulteriori permessi a condizione che l'opera originale sia attribuita come specificato nelle pagine SAGE e Open Access (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

<sup>2</sup> In particolare, le cellule immunitarie perdono la loro capacità di ripulire le cellule non funzionali, dando luogo a un fenomeno chiamato "immunosenescenza" che altera la capacità del sistema immunitario di rispondere agli stimoli nocivi. Questo fenomeno causa quindi l'accumulo di cellule senescenti, innescando l'infiammazione e aumentando lo sviluppo di danni agli organi e di malattie legate all'invecchiamento, come il diabete mellito, la sarcopenia e il cancro. <sup>2,3</sup> In questo contesto, è stato dimostrato che le citochine pro-infiammatorie come l'interleuchina (IL)-1 $\beta$ , l'IL-6, il fattore di necrosi tumorale (TNF), l'IFN- $\gamma$  e l'IL-1RA giocano un ruolo fondamentale, in quanto possono favorire l'espansione di cloni del sistema ematopoietico/immunitario a seconda della diffusione dei segnali infiammatori.

<sup>1</sup> Parallelamente, l'aumento dello stress ossidativo associato all'età, derivante da una riduzione delle difese antiossidanti e da un aumento della produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), soprattutto quelli di origine mitocondriale, rappresenta un importante stimolo per l'attivazione della risposta infiammatoria. <sup>4</sup> A livello vascolare, l'invecchiamento è associato a uno stato di squilibrio costituito da alti livelli di ROS e bassi livelli di NO che influisce gradualmente sulla struttura e sulla funzione dei vasi sanguigni, causando così la perdita di elasticità della parete arteriosa, con conseguente disfunzione endoteliale, potenzialmente responsabile dei disturbi cronici legati all'età, come le malattie cardiovascolari (CVD), le malattie renali croniche, il cancro, la depressione, la demenza, l'osteoporosi, la sarcopenia, la disabilità fisica e cognitiva e la fragilità. <sup>5</sup> Di interesse, diversi studi suggeriscono che il consumo regolare di acqua minerale con particolari contenuti di elettroliti può essere un valido strumento per migliorare la funzionalità dell'organismo, disintossicandolo dalla presenza di ROS. <sup>6</sup> Inoltre, è stato dimostrato che l'acqua minerale bicarbonata riduce i livelli di colesterolo e glucosio, svolgendo così un effetto preventivo sulle CVD. <sup>7,8</sup> In particolare, l'assunzione di acqua minerale acida con una bassa concentrazione di potassio, calcio e magnesio migliora l'omeostasi metabolica e redox nei ratti con sindrome metabolica. <sup>9</sup> Inoltre, diversi studi riportano che il consumo di acqua minerale naturale può ridurre efficacemente i marcatori di stress ossidativo, <sup>10</sup> influenzare positivamente l'omeostasi tissutale e contrastare l'insorgenza dell'infiammazione e prevenire le malattie correlate. Sulla base di queste premesse, il presente studio è stato progettato per valutare i presunti effetti benefici dell'acqua minerale (acqua San Carlo®) con un contenuto elettrolitico simile a quello del plasma umano in un modello preclinico di infiammazione vascolare.

## Materiali e metodi

### Reagenti

L'acqua San Carlo® è stata gentilmente fornita da San Carlo S.p.A. (San Carlo Terme, Massa, Italia). Le composizioni specifiche dell'acqua San Carlo® e dell'acqua di controllo sono riportate nella tabella I. L'acqua San Carlo® sgorga naturalmente nel Parco delle Alpi Apuane (San Carlo Terme, Massa, Italia). È caratterizzata da un elevato contenuto

naturale di ossigeno, da un rapporto sodio/potassio simile a quello umano (Tabella 2) e da un livello di pH leggermente acido, che non perturba l'ambiente acquoso fisiologico delle cellule umane.<sup>12</sup>

### Metodologie sperimentali

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti Wistar maschi giovani (10 settimane) e anziani (40 settimane). Gli animali sono stati alimentati con cibo standard da laboratorio (Envigo, Udine, Italia) e acqua di controllo ad libitum, e non sono stati impiegati per almeno una settimana dopo la consegna al laboratorio. Sono stati alloggiati in gabbie a fondo solido, dotate di inserti sul fondo in rete metallica per prevenire la coprofagia, e situati in stanze a temperatura controllata (a 22°C-24°C e 50%-60% di umidità) con un ciclo di luce di 12 ore (06:00-18:00). La cura e la manipolazione degli animali sono state conformi alle disposizioni della Direttiva 210/63/UE del Consiglio della Comunità Europea, riconosciuta e adottata dal Governo italiano. Gli esperimenti sono stati approvati dal Comitato Etico per la Sperimentazione Animale dell'Università di Pisa e dal Ministero della Salute italiano (autorizzazione n D4133.N.RU6).

Dopo 1 settimana di acclimatazione, l'acqua di controllo è stata sostituita dall'acqua San Carlo® in un gruppo di ratti giovani e in un gruppo di ratti anziani. L'acqua San Carlo® è stata gentilmente fornita da San Carlo S.p.A.

La suddivisione dei gruppi è la seguente (10 animali per gruppo):

- Ratti giovani a cui è stata somministrata acqua San Carlo® per 3 mesi.
- Ratti anziani a cui è stata somministrata acqua San Carlo® per 3 mesi.
- Ratti giovani somministrati con acqua di controllo per 3 mesi.
- Ratti anziani a cui è stata somministrata l'acqua di controllo per 3 mesi.

### Preparazione delle piccole arterie mesenteriche per gli esperimenti funzionali

Dopo la dissezione, il primo ramo dell'arteria mesenterica è stato posto in soluzione salina fisiologica (PSS) fredda (4°C) contenente (in mmol/L) NaCl 120, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4,7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, MgSO<sub>4</sub> 1,18, CaCl<sub>2</sub> 2,5, EDTA 0,026 e glucosio 5,5, come precedentemente pubblicato.<sup>13</sup> Un ramo di secondo ordine dell'albero arterioso mesenterico (lunghezza  $\approx$ 2 mm) è stato sezionato e montato su una microcannula di vetro in un miografo pressurizzato, come precedentemente pubblicato.<sup>13</sup> I vasi sono stati equilibrati per 60 minuti a pressione intraluminale costante (45 mmHg) in PSS riscaldato (37°C) e gorgogliato (95% di aria e 5% di CO<sub>2</sub>), a pH 7,4. I vasi sono stati considerati vitali e utilizzati se si sono costretti oltre il 70% del loro diametro

**Tabella 1.** Composizione di Acqua San Carlo® e dell'acqua di controllo.

Composizione	Unità di misura	acqua San Carlo®	acqua di controllo
PH alla fonte	pH	5, 7	7, 7
Residuo fisso (a 180°C)	mg/L	63	348
Durezza °F	°F	1, 9	26
Conducibilità elettrica specifica	µS/cm at 20°C	85	483
Calcio	mg/L Ca	2, 8	85
Magnesio	mg/L Mg	3, 0	12
Ammonio	mg/L NH <sub>4</sub>	<0, 05	<0, 1
Cloruri	mg/L Cl	15, 3	28
Solfati	mg/L SO <sub>4</sub>	2, 6	98
Potassio	mg/L K	0, 34	1, 4
Sodio	mg/L Na	9, 3	20
Nitrati	mg/L NO <sub>3</sub>	10, 4	3
Silicio	mg/L Si	10, 0	n.d.
Fluoruri	mg/L F	<0, 1	<0, 2

Abbreviazioni: Ca, calcio; Cl, cloro; F, fluoro; K, potassio; Mg, magnesio; Na, sodio; n.d., non rilevato; NH<sub>4</sub>, ammonio; NO<sub>3</sub>, nitrato; Si, silicio; SO<sub>4</sub>, solfato.

del lume a riposo in risposta all'applicazione extra-luminale di una soluzione ad alto contenuto di potassio (125 mmol/L di KCl) contenente 100 µmol/L di noradrenalina (NA).

#### Rimodellamento vascolare e funzione endoteliale

L'effetto rilasciante sui vasi endotelio-dipendente e indipendente in tutti i gruppi sperimentali è stata definita dalla risposta vasodilatatoria a concentrazioni cumulative rispettivamente di Ach (0,001-100 µM) e nitroprussiato di sodio (SNP) (0,01-100 µM). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in vasi precontrattati con NA (10 µM). Per garantire un'uguale contrattilità indotta dalla NA nei vasi di ratti giovani e anziani, abbiamo eseguito esperimenti preliminari per valutare la quantità di vasocostrizione indotta da concentrazioni crescenti di NA (da 1 nM a 100 µM). I risultati di questi esperimenti hanno mostrato che la NA 10 µmol/L era in grado di suscitare contrazioni simili tra i diversi gruppi (dati non mostrati), pertanto tale concentrazione è stata scelta per gli esperimenti funzionali. Per valutare la percentuale di vasodilatazione endotelio-dipendente dovuta alla disponibilità di NO, sono state costruite curve concentrazione-risposta di Ach dopo 30 minuti di preincubazione con l'inibitore della NOS Nw-nitro-L-arginina metilestere ([L-NAME] 100 µM, Sigma Co., St. Louis, MO, Stati Uniti).

Per valutare l'influenza dei ROS sulla disponibilità di NO, le curve concentrazione-risposta all'ACh sono state ripetute in presenza dell'antiossidante acido ascorbico (100 µM, Sigma, 30 minuti di pre-incubazione). Infine, per valutare se la generazione di ROS potesse compromettere il rilassamento endotelio-dipendente mediato da NO, è stato infuso ACh durante l'incubazione simultanea con L-NAME e acido ascorbico. I vasi sono stati poi disattivati mediante perfusione con PSS privo di Ca<sup>2+</sup> contenente 10 mmol/L EGTA per 30 minuti. Lo spessore della media e il diametro del lume sono stati misurati in tre punti diversi di ciascuna piccola arteria per ottenere il rapporto medialume (M/L), con una pressione intraluminale di 45 mmHg.<sup>13</sup> L'area della sezione trasversale media (MCSA) è stata ottenuta sottraendo le aree trasversali interne da quelle esterne utilizzando i diametri esterni e del lume, come precedentemente descritto.<sup>14</sup>

#### Rilevazione della produzione di anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a livello vascolare

La produzione in situ di anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) da sezioni di vasi mesenterici congelati di 30 mm è stata valutata al microscopio confocale mediante il colorante fluorescente diidroetidio ([DHE] Sigma), come precedentemente descritto.<sup>13</sup>

**Tabella 2.** Concentrazione di sodio (Na) e potassio (K) nell'acqua di controllo, nell'acqua San Carlo® e concentrazione media nel siero umano e rispettivi rapporti.

Elettroliti	Unità di misura	Concentrazione nell'acqua San Carlo®	Concentrazione nell'acqua di controllo	Concentrazione media nel siero umano
Sodio	mmol/L Na	0.406 <sup>a</sup>	0.870 <sup>a</sup>	140 <sup>11</sup>
Potassio	mmol/L K	0.009 <sup>a</sup>	0.035 <sup>a</sup>	3.5 <sup>11</sup>
Rapporto n	n.a.	45	24	40

Abbreviazioni: K, potassio; Na, sodio; n.d. non applicabile.

La concentrazione in <sup>a</sup>mmol/L di Na e K nell'acqua di controllo e nell'acqua San Carlo® è stata calcolata dividendo la concentrazione in mg/L di Na e K (Tabella 1) per la loro massa molare (rispettivamente 22,99 g/mol e 39,10 g/mol).

Tre vetrini per segmento sono stati analizzati simultaneamente dopo l'incubazione con la soluzione di Krebs a 37°C per 30 minuti. Il tampone Krebs-HEPES contenente 2  $\mu$ M di DHE è stato quindi applicato a ciascuna sezione e valutato al microscopio a fluorescenza. In presenza di O<sub>2</sub>, il DHE subisce un'ossidazione e si intercala nel DNA cellulare, colorando così il nucleo con una fluorescenza rossa (eccitazione a 488 nm ed emissione a 610 nm). La percentuale di area della parete arteriosa colorata con il segnale rosso è stata normalizzata rispetto all'area totale esaminata e quantificata utilizzando un software di analisi delle immagini (McBiophotonics Image J; National Institutes of Health, Bethesda, MD, Stati Uniti).

#### **Livelli plasmatici di IL-1 $\beta$ e TNF**

I livelli plasmatici di IL-1 $\beta$  e TNF sono stati misurati utilizzando un kit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) disponibile in commercio (Biosciences), secondo le indicazioni del produttore. Per la procedura sono state utilizzate aliquote (100  $\mu$ L) di plasma. I livelli di IL-1 $\beta$  e TNF sono stati espressi come pg/mL di plasma.

#### **Livelli di malondialdeide (MDA) nel plasma**

I livelli di malondialdeide (MDA) nel plasma sono stati valutati per studiare la perossidazione lipidica, un indice di stress ossidativo. Le concentrazioni di MDA nel plasma sono state determinate con un test colorimetrico (Calbiochem, San Diego, CA, USA) e i risultati sono stati espressi come  $\mu$  mol di MDA/ml di plasma.

#### **Livelli urinari di 8-isoprostani e pH**

I campioni di urina sono stati raccolti in quattro momenti diversi durante lo studio: T<sub>0</sub> (il primo giorno dell'esperimento), T<sub>1</sub> (1 mese dopo il primo giorno dello studio), T<sub>2</sub> (2 mesi dopo il primo giorno dello studio) e T<sub>3</sub> (3 mesi dopo il primo giorno dello studio, immediatamente prima del sacrificio). Dopo ogni punto temporale, il pH dell'urina è stato misurato utilizzando un elettrodo di vetro su un pH-metro Beckman f390. Quindi, aliquote (100  $\mu$ L) di urina sono state utilizzate per valutare i livelli di 8-isoprostani, un marcatore dello stress ossidativo, utilizzando un saggio ELISA competitivo (Abcam ab175819 Cambridge, Regno Unito).

#### **Analisi statistica**

I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. La significatività delle differenze è stata valutata per i dati grezzi, prima della normalizzazione percentuale, mediante ANOVA a una via seguita dall'appropriato test post hoc.  $p < 0,05$  è stato considerato significativo. I preparati colonici inclusi in ciascun gruppo di test sono stati ottenuti da animali diversi, pertanto il numero di prove è sempre stato uguale al numero di animali assegnati al gruppo. I calcoli e le analisi sono stati eseguiti con GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Per stimare le dimensioni del campione per ogni esperimento è stata utilizzata un'analisi di potenza.

## **Risultati**

### **Rilassamento e rimodellamento vascolare dipendente dall'endotelio**

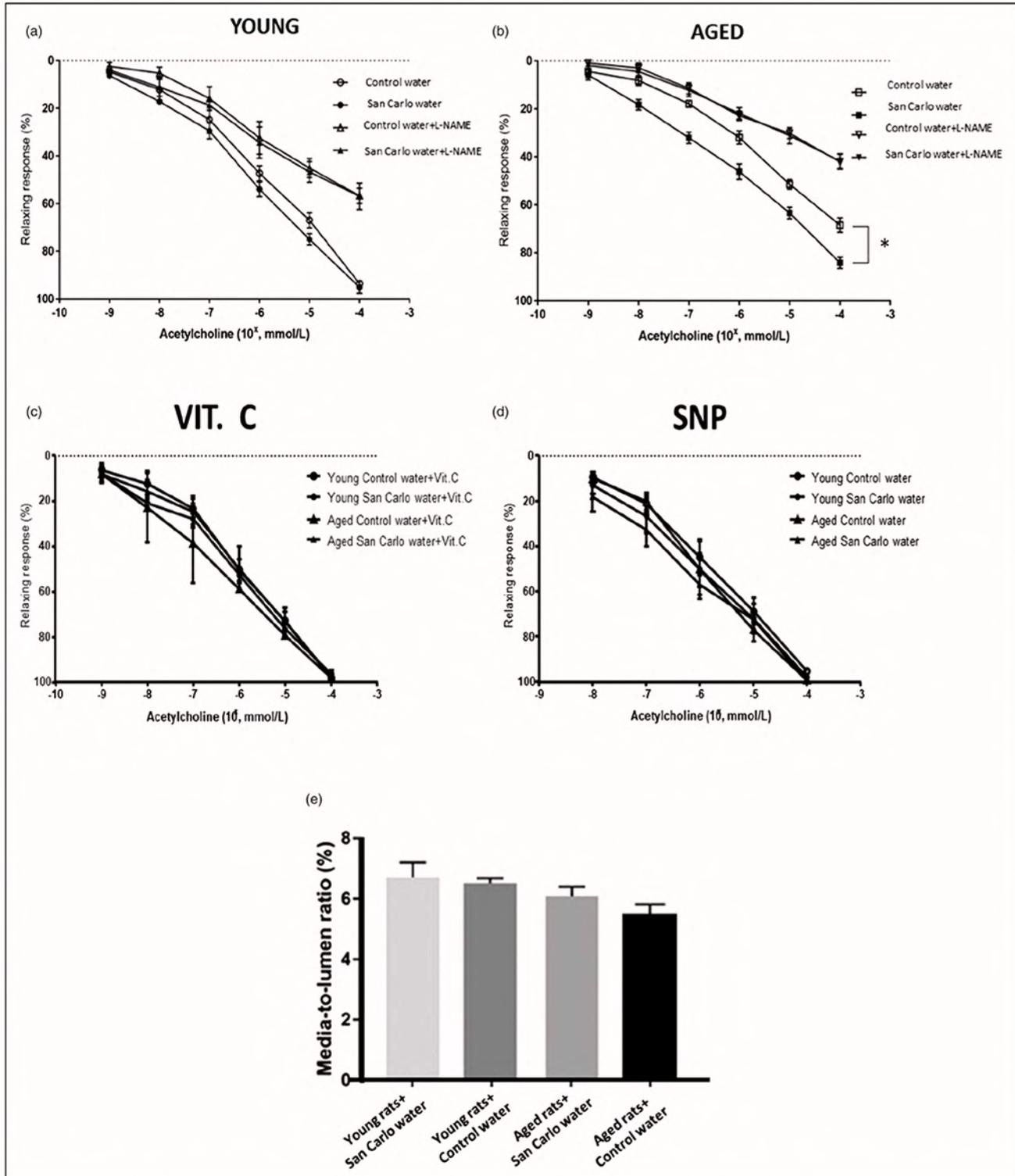
Nei vasi mesenterici di ratti giovani, il rilassamento all'ACh è stato significativamente attenuato dal L-NAME (100  $\mu$ M) (Figura 1(a)). Il trattamento dei ratti giovani con acqua di controllo o San Carlo® non ha modificato i modelli di risposta all'ACh nei vasi mesenterici, in assenza o in presenza di L-NAME (Figura 1(a)). I vasi mesenterici di ratti anziani a cui è stata somministrata l'acqua di controllo hanno mostrato una ridotta risposta vasodilatante all'ACh rispetto agli animali giovani (Figura 1(b)). La vasodilatazione ridotta osservata nei ratti anziani è stata salvata dall'incubazione dei vasi con l'acido ascorbico (scavenger dei ROS), suggerendo che la disfunzione endoteliale osservata negli animali anziani è dovuta principalmente a un'aumentata produzione di ROS all'interno della parete vascolare (Figura 1(c)). Al contrario, la somministrazione di acqua San Carlo® ha aumentato il rilassamento all'ACh nei vasi mesenterici di ratti anziani (Figura 1(b)). L'incubazione dei vasi con nitroprussiato di sodio (SNP) in combinazione con o senza l'acqua San Carlo® ha ripristinato una risposta vasodilatatoria completa, suggerendo che le vie endoteliali indipendenti contribuiscono al miglioramento del rilasciamento all'ACh indotto dall'acqua San Carlo® (Figura 1(d)). Non sono state osservate differenze nel rapporto media-lume dei ratti giovani o anziani a cui è stata somministrata l'acqua di controllo o San Carlo® (Figura 1(e)).

### **Generazione di O<sub>2</sub> a livello vascolare**

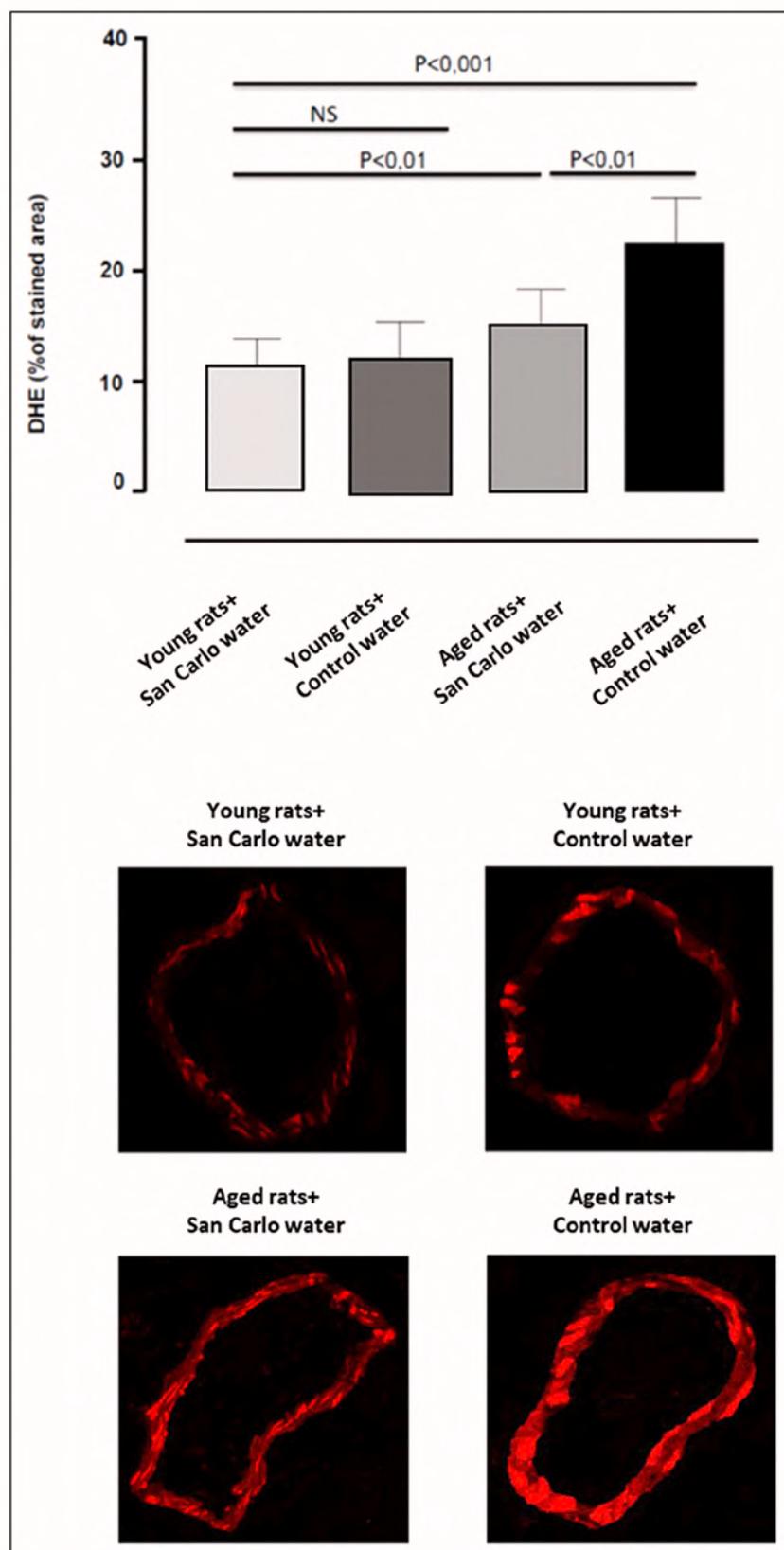
Il test DHE ha rivelato un aumento significativo della produzione di O<sub>2</sub> nei vasi dei ratti anziani a cui è stata somministrata acqua di controllo rispetto agli animali giovani (Figura 2). I ratti giovani a cui è stata somministrata l'acqua San Carlo® non hanno modificato la produzione di O<sub>2</sub> (Figura 2), mentre l'ingestione di acqua San Carlo® nei ratti anziani ha contrastato in modo significativo tale incremento (Figura 2).

### **Livelli di IL-1 $\beta$ , TNF e MDA nel plasma**

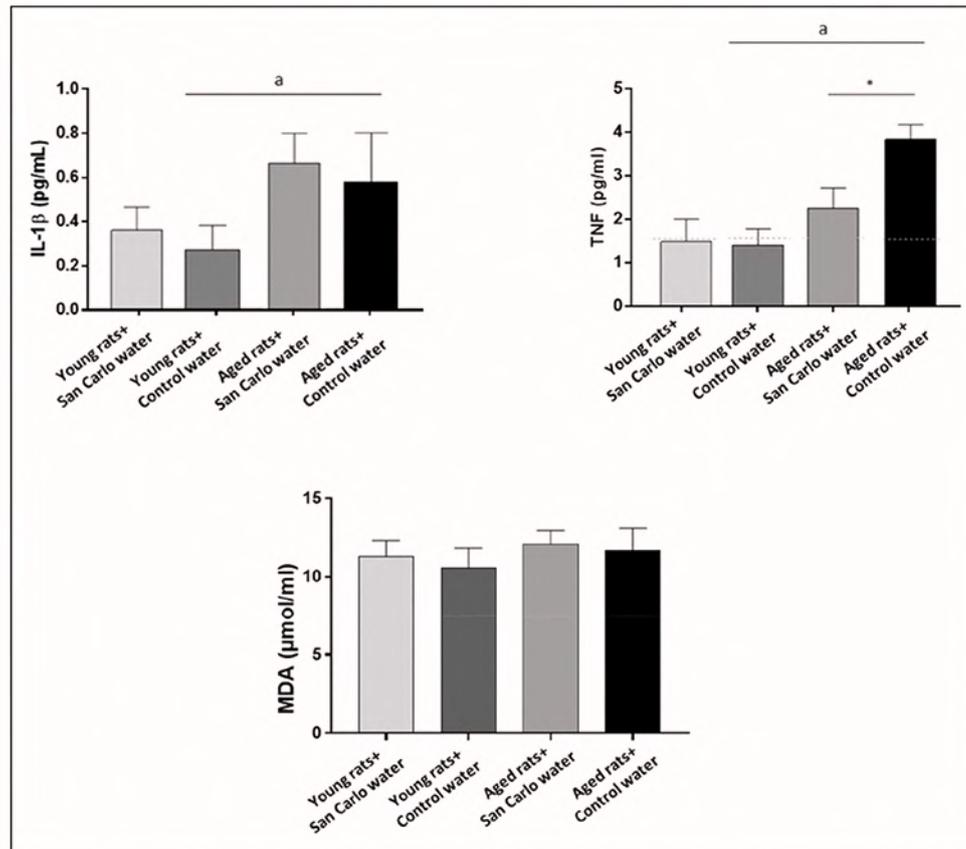
I livelli di IL-1 $\beta$  e TNF nel plasma di animali anziani a cui è stata somministrata l'acqua di controllo sono risultati significativamente aumentati rispetto agli animali giovani (Figura 3). La somministrazione di acqua San Carlo® agli animali anziani ha ridotto i livelli di TNF ma non di IL-1 $\beta$  verso i valori di controllo, mentre non ha prodotto alcun effetto significativo nei ratti giovani (Figura 3). Non sono stati osservati cambiamenti significativi nei livelli di MDA nei ratti giovani e anziani a cui è stata somministrata acqua San Carlo® o di controllo (Figura 3).



**Figura 1.** Risposta rilasciante endotelio-dipendente delle arterie di resistenza mesenteriche all'acetilcolina in (a) ratti giovani e (b) ratti anziani trattati con acqua di controllo o acqua San Carlo® per 3 mesi. (c) Ripristino della vasodilatazione Ach-dipendente in ratti anziani dopo incubazione dei vasi con acido ascorbico (scavenger di ROS). (d) Risposta vasodilatatoria indotta dalla pre-incubazione dei vasi con nitroprussiato di sodio (SNP). (e) Rapporto media-lume delle arterie mesenteriche di ratti giovani e anziani trattati con acqua di controllo o acqua San Carlo® per 3 mesi. Ogni colonna rappresenta la media  $\pm$  SEM di otto animali. Statistiche: analisi della varianza a una via seguita dal test di Newman-Keuls.



**Figura 2.** Analisi quantitativa (grafico a barre) e colorazione rappresentativa del diidroetidio (DHE) e del segnale rosso nelle arterie mesenteriche (ingrandimento  $\times 40$ ) di ratti giovani e anziani trattati con acqua di controllo o acqua San Carlo® per 3 mesi. Ogni colonna rappresenta la media  $\pm$  SEM di otto animali. Statistiche: analisi della varianza a una via seguita dal test di Newman-Keuls.



**Figura 3.** Livelli di IL-1 $\beta$ , TNF e MDA nel plasma ottenuto da ratti giovani e anziani trattati con acqua di controllo o acqua San Carlo® per 3 mesi. Ogni colonna rappresenta la media  $\pm$  SEM di otto animali. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , differenza significativa rispetto al ratto giovane + acqua di controllo; <sup>b</sup> $p < 0,05$ , differenza significativa rispetto ai ratti anziani + acqua di controllo. Statistiche: analisi della varianza a una via seguita dal test di Newman-Keuls.

### Stress ossidativo e pH urinario

I ratti giovani e quelli anziani hanno mostrato livelli comparabili di 8-isoprostani nelle urine (Figura 4). La somministrazione di San Carlo®, ma non di acqua di controllo, ha ridotto significativamente i livelli di questo marker dello stress ossidativo in entrambi i gruppi di animali (Figura 4). Valutando i valori del pH urinario in quattro diversi momenti ( $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$ ), abbiamo osservato che l'acqua San Carlo® ha ridotto, anche se non in modo significativo, il pH urinario in entrambi i gruppi di animali, il pH urinario sia nei ratti giovani che in quelli anziani (Figura 4) rispetto ai ratti a cui è stata somministrata l'acqua di controllo (Figura 4).

### Discussione

Durante l'invecchiamento fisiologico, è stata osservata un'inflammatione cronica sterile che colpisce il sistema immunitario innato, nota come "inflammaging".<sup>15</sup> Questa condizione è guidata da diversi meccanismi legati all'età, che inducono la senescenza cellulare, come la funzione mitocondriale alterata, il danno al DNA, l'accorciamento dei telomeri e lo stress ossidativo insieme all'iperattivazione dei mediatori proinflammatori.<sup>16</sup> In particolare, lo stress ossidativo e l'inflammatione hanno meccanismi interdipendenti che, a loro volta, inducono e

si esacerbano a vicenda.<sup>17</sup> Infatti, l'invecchiamento è caratterizzato da una maggiore produzione di ROS e da una concomitante compromissione dei sistemi antiossidanti endogeni.<sup>18</sup> Questo livello di inflammatione cronica di basso grado, che caratterizza l'inflammaging, è stato riconosciuto come un aspetto cruciale di diverse malattie cardiovascolari, contribuendo alla patogenesi e agli esiti di queste malattie legate all'età.<sup>19</sup> Vale la pena notare che le malattie cardiovascolari sono la principale causa di morte in tutto il mondo, con un'incidenza crescente negli individui anziani.<sup>5</sup> Infatti, l'invecchiamento vascolare è associato a disfunzioni microvascolari, seguite da rimodellamento vascolare patologico e rigidità vascolare, che predispongono all'aterosclerosi grave.<sup>20</sup> È interessante notare che è stato osservato che l'invecchiamento vascolare inizia durante l'infanzia con un graduale cambiamento nella struttura vascolare e nella disfunzione endoteliale, portando a una ridotta compliance vascolare e a una maggiore rigidità arteriosa negli anziani.<sup>21</sup> Il presente studio ha dimostrato che l'assunzione di acqua San Carlo® ha ridotto significativamente i livelli sistemici di TNF e lo stress ossidativo in situ nella parete vascolare, con un conseguente miglioramento della compromissione della vasorilassazione endoteliale nei ratti anziani.

Nel corso degli anni, è stata rivolta sempre più attenzione ai presunti effetti benefici della crenoterapia nella gestione di

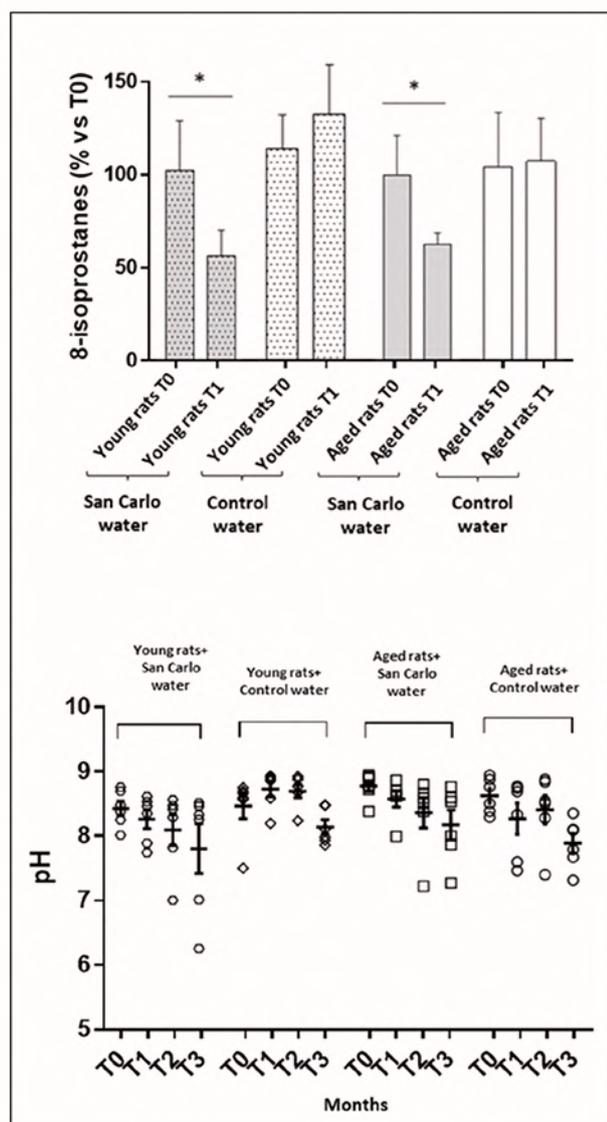


Figura 4. Analisi dell'8-isoprostano e livelli di pH nelle urine ottenute da ratti giovani e anziani trattati con acqua di controllo o acqua San Carlo® per 3 mesi. Ogni colonna rappresenta la media  $\pm$  SEM di otto animali. \* $p < 0,05$ , differenza significativa rispetto al rispettivo T<sub>0</sub>. Statistiche: analisi della varianza a una via seguita dal test di Newman-Keuls.

malattie reumatologiche, respiratorie o dermatologiche caratterizzate da infiammazione.<sup>22-24</sup> In particolare, le acque termali producono un effetto protettivo sulle membrane cellulari e sul DNA genomico, in virtù delle loro proprietà antiossidanti e antinfiammatorie.<sup>25</sup> Infatti, uno studio comparativo ha dimostrato un effetto inibitorio delle acque termali La Roche Posay e Avène sulla formazione di IL-6 e ROS in una linea cellulare di cheratinociti umani irradiata con UVB.<sup>26</sup> Recentemente, Sun et al. hanno descritto la capacità di un trattamento con acqua di sopprimere le citochine pro-infiammatorie tra cui TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  e NF- $\kappa$ B p65, con un effetto anti-ipertensivo finale.<sup>27</sup> Dai nostri esperimenti funzionali,

abbiamo osservato che le piccole arterie mesenteriche di ratti anziani hanno mostrato rilassamenti endotelio-dipendenti alterati a causa di una ridotta disponibilità di NO. È probabile che tale carenza dipenda da una maggiore generazione intravascolare di ROS, come documentato dalla maggiore fluorescenza DHE nella parete vascolare di animali anziani rispetto ai ratti giovani. A questo proposito, è stato ampiamente dimostrato che la sovrapproduzione di O<sub>2</sub> gioca un ruolo significativo nello sviluppo della disfunzione endoteliale, attraverso la reazione con NO e la successiva produzione di perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>).<sup>13</sup> In linea con i nostri risultati, precedenti prove hanno mostrato una marcata disfunzione endoteliale associata a una significativa condizione proossidante vascolare negli animali anziani.<sup>28,29</sup> Inoltre, le prove provenienti da studi clinici hanno evidenziato che la disfunzione endoteliale si verifica durante il processo di invecchiamento umano, innescando l'insorgenza di molte vasculopatie.<sup>30</sup> Gli autori hanno osservato che la disfunzione endoteliale dipendente dall'età nei vasi umani è dovuta all'effetto combinato dello stress ossidativo e dell'infiammazione della parete vascolare.<sup>30</sup> A questo proposito, è stato ampiamente dimostrato che i livelli circolanti di TNF sono più elevati nelle arterie carotidi, nella parete aortica e nel cuore dei roditori anziani e degli esseri umani più anziani.<sup>31</sup> Questi studi hanno dimostrato che la somministrazione di TNF esogeno può indurre stress ossidativo regolando positivamente/attivando la NADPH ossidasi, migliorando la disfunzione endoteliale e l'apoptosi. Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, i nostri dati sui livelli di TNF nelle arterie mesenteriche dei ratti anziani hanno confermato una condizione di infiammazione di basso grado correlata all'età che può portare a un aumento dello stress ossidativo, esercitando così un effetto dannoso sulla funzione endoteliale.<sup>31</sup> La somministrazione di acqua San Carlo® ha ridotto notevolmente i livelli circolanti di TNF, migliorando così la disfunzione endoteliale nei ratti anziani. Inoltre, è stato osservato che il TNF funge da uno dei mediatori chiave coinvolti nella formazione di ROS intracellulari.<sup>32</sup> Infatti, nelle cellule endoteliali, l'NO è responsabile del mantenimento dell'omeostasi vascolare e quindi una riduzione della biodisponibilità di NO, risultante dalla ridotta produzione di NO e/o dall'aumentata degradazione di NO da parte di O<sub>2</sub>, segna l'insorgenza della disfunzione endoteliale.<sup>33</sup> In particolare, O<sub>2</sub> reagisce con NO, portando alla formazione di ONOO<sup>-</sup>, che causa la nitratura delle proteine e contribuisce alla disfunzione e alla morte delle cellule endoteliali.<sup>33</sup> Parallelamente all'aumento dei livelli plasmatici di TNF, il nostro test DHE ha rivelato un aumento significativo della produzione di O<sub>2</sub> nei vasi di ratti anziani, che è stata significativamente ridotta dalla somministrazione di acqua San Carlo®. Tale effetto inibitorio sulla produzione di ROS potrebbe essere attribuibile alla capacità dell'acqua San Carlo® di ridurre il livello di TNF circolante. Infatti, come precedentemente descritto, il TNF sta emergendo come regolatore della generazione di ROS e specie reattive dell'azoto tramite attivazione di NF- $\kappa$ B.<sup>34</sup> Tuttavia, non possiamo escludere un effetto antiossidante dell'acqua San Carlo® correlato alla presenza di ioni coinvolti in modo rilevante nel corretto funzionamento dei sistemi antiossidanti endogeni, tra cui SOD, CAT e GPx. In linea con questa evidenza, è stato osservato un marcato

effetto antiossidante dell'acqua San Carlo® non solo nei ratti anziani ma anche nei ratti giovani a livello urinario. Infatti, la somministrazione di acqua San Carlo® ha determinato una marcata riduzione degli 8-isoprostani, un riconosciuto biomarcatore urinario dello stress ossidativo.<sup>35</sup> Per questo motivo, saranno progettati ulteriori studi per valutare meglio un presunto effetto diretto dell'acqua San Carlo® sui sistemi antiossidanti endogeni.

Da notare che l'acqua San Carlo® è caratterizzata da una maggiore concentrazione di silicio (Si) rispetto all'acqua di controllo. Questo è un punto interessante poiché è stato ampiamente dimostrato che il Si ha un ruolo fondamentale nell'omeostasi dei tessuti connettivi e delle ossa. In particolare, è stata osservata una riduzione dei livelli di Si nei tessuti connettivi aortici di pazienti anziani, con conseguenti alterazioni della reattività dei vasi.<sup>36</sup> Sulla base di questa premessa, possiamo ipotizzare che l'effetto migliorativo dell'assunzione di acqua San Carlo®, ma non di acqua di controllo, sulla reattività vascolare negli animali anziani potrebbe essere, almeno in parte, attribuibile alla maggiore presenza di Si.

In conclusione, i risultati attuali suggeriscono che l'uso di acqua San Carlo® può contrastare efficacemente l'infiammazione di basso grado tipicamente associata all'età e la disfunzione vascolare correlata, probabilmente attraverso proprietà sia antiossidanti che antinfiammatorie.

## Affermazioni e dichiarazioni

### Contributi degli autori

Conception, L.A.; esecuzione del lavoro: V.D., L.B., C.D.S., G.V., S.M., A.M. ed E.D.; interpretazione dei dati, E.D., L.B., A.M. e C.D.S.; stesura dell'articolo, L.A. e M.F. Tutti gli autori hanno letto e hanno accettato la versione pubblicata del manoscritto.

### Conflitto di interessi

Gli autori hanno dichiarato di non avere potenziali conflitti di interesse in merito alla ricerca, alla paternità e/o alla pubblicazione di questo articolo.

### Finanziamento

Gli autori hanno dichiarato di aver ricevuto il seguente supporto finanziario per la ricerca, la paternità e/o la pubblicazione di questo articolo: Questo studio è stato supportato da una sovvenzione di San Carlo S.p.A (539901\_2020\_ANTONIOLI\_STUDIO\_S.CARLO), che non ha avuto alcun coinvolgimento diretto nella progettazione dello studio, nell'acquisizione dei dati, nell'interpretazione dei dati o nella decisione di inviare questo lavoro per la pubblicazione.

### ORCID iD

Clelia Di Salvo <https://orcid.org/0009-0002-7083-4214>

### Riferimenti

1. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, et al. Inflammaging: un nuovo punto di vista immuno-metabolico per le malattie legate all'età. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14: 576–590. DOI: 10.1038/S41574-018-0059-4.

2. Li X, Li C, Zhang W, et al. Inflammation and aging: Signaling pathways and intervention therapies. *Signal Transduct Targeted Ther* 2023; 8: 239. DOI: 10.1038/S41392-023-01502-8.

3. López-Otin C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153: 1194–1217. DOI: 10.1016/J.CELL.2013.05.039.

4. Hekimi S, Lapointe J, and Wen Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* 2011; 21: 569–576. DOI: 10.1016/J.TCB.2011.06.008.

5. Ferrucci L and Fabbri E. Inflammaging: Chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* 2018; 15: 505–522. DOI: 10.1038/S41569-018-0064-2.

6. Braga PC, Ceci C, Marabini L, et al. The antioxidant activity of sulphurous thermal water protects against oxidative DNA damage: A comet assay investigation. *Drug Res* 2013; 63: 198–202. DOI: 10.1055/S-0033-1334894.

7. Toxqui L and Vaquero MP. An intervention with mineral water decreases cardiometabolic risk biomarkers. A crossover, randomised, controlled trial with two mineral waters in moderately hypercholesterolaemic adults. *Nutrients* 2016; 8: 400. DOI: 10.3390/NU8070400.

8. Schoppen S, Pe´rez-Granados AM, Carbajal A´, et al. A sodium-rich carbonated mineral water reduces cardiovascular risk in postmenopausal women. *J Nutr* 2004; 134: 1058–1063. DOI: 10.1093/JN/134.5.1058.

9. Pereira CD, Severo M, Ara´ujo JR, et al. Relevance of a hypersaline sodium-rich naturally sparkling mineral water to the protection against metabolic syndrome induction in fructose-fed Sprague-Dawley rats: A biochemical, metabolic, and redox approach. *Internet J Endocrinol* 2014; 2014: 384583. DOI: 10.1155/2014/384583.

10. Costantino M, Giuberti G, Caraglia M, et al. Possible antioxidant role of SPA therapy with chlorine-sulphur carbonate mineral water. *Amino Acids* 2009; 36: 161–165. DOI: 10.1007/s00726-008-0032-y.

11. Oria M, Harrison M, Stallings VA, et al. (eds) Dietary reference intakes for sodium and potassium. Washington, DC: National Academies Press, 2019. DOI: 10.17226/25353.

12. Jin X, Zhou M, Chen S, et al. Effects of PH alterations on stress- and aging-induced protein phase separation. *Cell Mol Life Sci* 2022; 79: 380. DOI: 10.1007/S00018-022-04393-0.

13. Gentile D, Fornai M, Pellegrini C, et al. Luteolin prevents cardiometabolic alterations and vascular dysfunction in mice with HFD-induced obesity. *Front Pharmacol* 2018; 9: 1094. DOI: 10.3389/FPHAR.2018.01094.

14. Bruno RM, Duranti E, Ippolito C, et al. Different impact of essential hypertension on structural and functional age-related vascular changes. *Hypertension* 2017; 69: 71–78. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08041.

15. Herrmann J, Xia M, Gummi MR, et al. Stressor-induced “inflammaging” of vascular smooth muscle cells via Nlrp3-mediated pro-inflammatory auto-loop. *Front Cardiovasc Med* 2021; 8: 752305. DOI: 10.3389/FCVM.2021.752305.

16. Barcena ML, Aslam M, Pozdniakova S, et al. Inflammaging cardiovascolare: meccanismi e aspetti traslazionali. *Cells* 2022; 11: 1010. DOI: 10.3390/CELLS11061010.
17. Zuo L, Prather ER, Stetskiy M, et al. Inflammaging e stress ossidativo nelle malattie umane: dai meccanismi molecolari ai nuovi trattamenti. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 4472. DOI: 10.3390/IJMS20184472.
18. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WPP, et al. Antiossidante e stress ossidativo: un'interazione reciproca nelle malattie legate all'età. *Front Pharmacol* 2018; 9: 1162. DOI: 10.3389/FPHAR.2018.01162.
19. Puspitasari YM, Ministrini S, Schwarz L, et al. Moderni concetti nelle malattie cardiovascolari: Inflamm-aging. *Front Cell Dev Biol* 2022; 10: 882211. DOI: 10.3389/FCELL.2022.882211.
20. Scuteri A, Cunha PG, Rosei EA, et al. Rigidità arteriosa e influenze della sindrome metabolica: uno studio cross-country. *Atherosclerosis* 2014; 233: 654–660. DOI: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2014.01.041.
21. Laina A, Stellos K e Stamatielopoulos K. Invecchiamento vascolare: meccanismi sottostanti e implicazioni cliniche. *Exp Gerontol* 2018; 109: 16–30. DOI: 10.1016/J.EXGER.2017.06.007.
22. Silva A, Oliveira AS, Vaz CV e altri. Potenziale antinfiammatorio delle acque termali portoghesi. *Sci Rep* 2020; 10: 22313. DOI: 10.1038/S41598-020-79394-9.
23. Viegas J, Esteves AF, Cardoso EM e altri. Effetti biologici dell'idrogeno solforato associato all'acqua termale sulle vie aeree umane e sulle cellule immunitarie associate: implicazioni per le malattie respiratorie. *Front Public Health* 2019; 7: 128. DOI: 10.3389/FPUBH.2019.00128.
24. Ba'lint GP, Buchanan WW, Adam A, et al. L'effetto dell'acqua minerale termale di Nagybaracska sui pazienti con osteoartrite del ginocchio: uno studio in doppio cieco. *Clin Rheumatol* 2007; 26: 890–894. DOI: 10.1007/S10067-006-0420-1.
25. Merial-Kieny C, Castex-Rizzi N, Selas B, et al. Acqua termale di Avène: un componente attivo con proprietà specifiche. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25(Suppl 1): 2–5. DOI:10.1111/J.1468-3083.2010.03892.X.
26. Kippenberger S, Z'oller N, Valesky E, et al. Impatto di diverse acque termali sui parametri di infiammazione nelle cellule umane cheratinocitarie HaCaT. *Ann Dermatol* 2015; 27: 709–714. DOI: 10.5021/ad.2015.27.6.709.
27. Sun Q, Xin F, Wen X, et al. Effetti protettivi di diversi tipi di acqua filtrata su topi ipertesi mediante la soppressione dello stress ossidativo e dell'infiammazione. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 2917387. DOI: 10.1155/2018/2917387.
28. Lee GH, Hoang TH, Jung ES, et al. Le antocianine attenuano la disfunzione endoteliale attraverso la regolazione del disaccoppiamento della sintasi dell'ossido nitrico nei ratti anziani. *Aging Cell* 2020; 19:e13279. DOI: 10.1111/ACEL.13279.
29. Yang Y, Wang D, Wan J, et al. Il ruolo del potenziale recettoriale transitorio Ankyrin I nella disfunzione endoteliale correlata all'età. *Exp Gerontol* 2021; 154: 111517. DOI: 10.1016/J.EXGER.2021.111517.
30. Rodriguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S, et al. La disfunzione endoteliale negli esseri umani anziani è correlata allo stress ossidativo e all'infiammazione vascolare. *Aging Cell* 2009; 8: 226–238. DOI: 10.1111/J.1474-9726.2009.00466.X.
31. Csizsar A, Wang M, Lakatta EG, et al. Infiammazione e disfunzione endoteliale durante l'invecchiamento: ruolo di NF-KappaB. *J Appl Physiol* 1985; 2008(105): 1333–1341. DOI: 10.1152/JAPPLPHYSIOL.90470.2008.
32. Chen X, Andresen B, Hill M, et al. Ruolo delle specie reattive dell'ossigeno nella disfunzione endoteliale indotta dal fattore di necrosi tumorale alfa. *Curr Hypertens Rev* 2008; 4: 245–255. DOI: 10.2174/157340208786241336.
33. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, et al. Stress ossidativo e specie reattive dell'ossigeno nella disfunzione endoteliale associata a malattie cardiovascolari e metaboliche. *Vasc Pharmacol* 2018; 100: 1–19. DOI: 10.1016/J.VPH.2017.05.005.
34. Blaser H, Dostert C, Mak TW, et al. TNF e ROS crosstalk nell'infiammazione. *Trends Cell Biol* 2016; 26: 249–261. DOI: 10.1016/J.TCB.2015.12.002.
35. Mukli P, Wu DH, Csipo T, et al. Biomarcatori urinari dello stress ossidativo nell'invecchiamento: implicazioni per la previsione dell'età biologica accelerata negli studi di coorte prospettici. *Oxid Med Cell Longev* 2022; 2022: 6110226. DOI: 10.1155/2022/6110226.
36. Jugdaohsingh R, Watson AIE, Pedro LD, et al. La diminuzione della concentrazione di silicio nei tessuti connettivi con l'età nei ratti è un marcatore del turnover del tessuto connettivo. *Bone* 2015; 75: 40–48. DOI: 10.1016/J.BONE.2015.02.004.