



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

Studio sull'ascorbato di potassio ed i suoi componenti

ESTRATTO DELLA RELAZIONE C. N. R.

Clara Maria Della Croce
Laboratorio di Mutagenesi ed Ecotossicità
Area di Ricerca del CNR - Pisa

PREMESSA

Questa relazione descrive lo stato di avanzamento dell'attività scientifica, svolta durante il periodo novembre 2001-ottobre 2002, nell'ambito del programma di ricerca concordato per il conferimento di un Assegno di ricerca dal titolo "Valutazione dell'impatto ambientale per la salvaguardia e la tutela della salute umana: studio degli effetti di xenobiotici sul sistema monoossigenasico, attività genetica di sostanze naturali, con particolare riferimento a quelle contenute nella dieta attraverso l'utilizzo dei test a breve termine".

In questo lavoro ci siamo occupati di valutare la genotossicità e la eventuale azione antimutagenica dei seguenti composti:

- ascorbato di potassio (e suoi componenti)
- ascorbato di potassio con ribosio

Per l'esecuzione degli esperimenti è stato utilizzato, come sistema genetico, il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, in quanto costituisce un modello genetico rapido, semplice e poco dispendioso oltre ad essere riconosciuto a livello internazionale come organismo modello in grado di dare informazioni ed indicazioni valide anche su strutture di eucarioti più complessi. Le metodiche ed i protocolli utilizzati, inoltre sono quelli ampiamente riconosciuti dalla Comunità scientifica per lo studio di altre sostanze con effetto potenzialmente analogo a quelle che sono state oggetto della nostra ricerca

Lo studio è stato svolto dalla dott.ssa Clara Maria Della Croce, nei Laboratori del reparto di Mutagenesi ed Ecotossicità dell'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA) (ex Istituto di Mutagenesi), presso l'Area di Ricerca del CNR a Pisa, sotto la responsabilità scientifica del Prof. Giorgio Bronzetti.

ASCORBATO DI POTASSIO

L'Ascorbato di potassio è un sale derivato dalla vitamina C facilmente solubile che si ottiene estemporaneamente sciogliendo in soluzione acquosa acido L-ascorbico e bicarbonato di potassio in forma cristallizzata purissima. I due componenti devono essere mantenuti separati (e protetti dall'umidità e dalla luce essendo igroscopici e fotosensibili) fino al momento dell'utilizzo perché la stabilità in soluzione viene mantenuta solo per poche ore. Lo studio sulle proprietà benefiche dell'ascorbato di potassio è iniziato casualmente alla fine degli anni '40 ad opera del Dott. Gianfrancesco Valsé Pantellini, biochimico fiorentino, sulla base di un fatto "fortuito": un amico orafo con un cancro inoperabile allo stomaco aveva ottenuto dei sorprendenti e straordinari benefici ingerendo, su suo consiglio, limonate zuccherate a cui, per errore, aggiungeva del bicarbonato di potassio invece dell'usatissimo bicarbonato di sodio.

L'importanza del potassio come cofattore e regolatore del metabolismo cellulare è stata anche recentemente messa in evidenza in alcuni articoli sui meccanismi di apoptosi cellulare [Hughes F, Bortner C, Purdy G, Cidlowski J (1997) Intracellular K^+ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* (272), 30567-30576] [Bortner C, Hughes F, Cidlowski JA (1997) Primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* (272):32436-32442] [Dallaporta B, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Larochette N, Brenner C, Marzo I, Kroemer G (1998): Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *J Immun* 5605-5615] [Hughes FM Jr, Cidlowski JA. (1999) Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo *Adv Enzyme Regul*, 39:157-171] [Montague J, Bortner C, Hughes F, Cidlowski J (1999) A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis.

Steroids, 64: 563-569].

Inoltre, da studi condotti da uno dei pionieri della Chimica italiana, il Prof. Ciamician, è emerso che il potassio svolgerebbe la sua attività metabolica intracellulare salificando reversibilmente i gruppi amminici e gli anelli pirrolici degli enzimi e delle proteine citoplasmatiche in ambiente leggermente acido.

Dagli studi del Dott. Pantellini [Valse Pantellini G (1970) Breve cenno sulla genesi dei tumori e sopra una eventuale terapia dei medesimi con sali di potassio e in particolare con ascorbato di potassio. Rivista di Patologia e Clinica XXV (5):219-225] [Valse Pantellini G (1974) Legami idrogeno (H) e salificazione degli stessi da parte del potassio (K) nella strutturazione della materia vivente. Rivista di Patologia e Clinica. XXIX (4):193-198] e della Fondazione Valse Pantellini [Valse Pantellini G, Paoli G (1999) Meccanismo d'azione dell'ascorbato di potassio nei sistemi biologici. LXXXV Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisica. Pavia, p.191] [Crocì S, Ortalli I, Pedrazzi G, Paoli G, Monetti D (2000) Azione protettiva dell'ascorbato di potassio sull'ossidazione dell'emoglobina in globuli rossi umani. LXXXVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisica, Palermo, 181] [Crocì S, Pedrazzi G, Paoli G, Monetti D, Bronzetti G, Ortalli I (2001) Potassium ascorbate as protective agent in oxidation of red cells. Abstract of the International Conference on Antioxidants in Cancer Prevention and Therapy, Athens Greece, 1571-1572], è stato messo in evidenza che, in presenza di stress ossidativo, nel citoplasma vengono danneggiati proprio gli anelli pirrolici degli enzimi, delle proteine e dell'ATP-asi, con conseguente perdita di potassio, già evidenziata da oltre cinquant'anni [Von Euler H, Skarzynski B (1945) La biochimica dei tumori. Einaudi. Torino. Cap.II, pp. 78-83] inoltre, l'ascorbato di potassio può trasferire rapidamente gli ioni K^+ all'interno della cellula, in virtù della sua struttura eterociclica, in grado di sostituire per analogia i gruppi pirrolici. In tal modo sembra che possa ripristinarsi la adeguata concentrazione di potassio intracellulare, essenziale per mantenere le funzioni metaboliche cellulari.

Inoltre, sodio, calcio, potassio, magnesio, presenti nei liquidi intra ed extracellulari, sono da considerarsi a vario titolo i "trasportatori dei segnali" fra cellula e cellula, perché queste permangono in un normale stato di proliferazione.

Proprio considerando che l'ascorbato di potassio è stato scarsamente studiato, lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutarne gli effetti genotossici ed antimutageni sia dei componenti che del composto in quanto tale, anche in combinazione con il ribosio, che ne dovrebbe potenziare l'efficacia. Lo studio è stato effettuato su cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* perché costituisce un modello genetico rapido e poco dispendioso per cercare di individuare i potenziali effetti tossici delle sostanze che devono essere saggiate [Plevani P, Foiani M, Lucchini G (1997): Il lievito: un organismo modello. *Le Scienze* 351: 84-92].

RISULTATI

Ceppo D7

Sostanze Singole

Sospensione: incubazione 2 ore in tampone a 37 °C (Fase stazionaria)

Non è stato messo in evidenza alcun effetto sulla sopravvivenza e sulla conversione genica a concentrazioni comprese tra 1 nM e 10mM (figure 1,2)

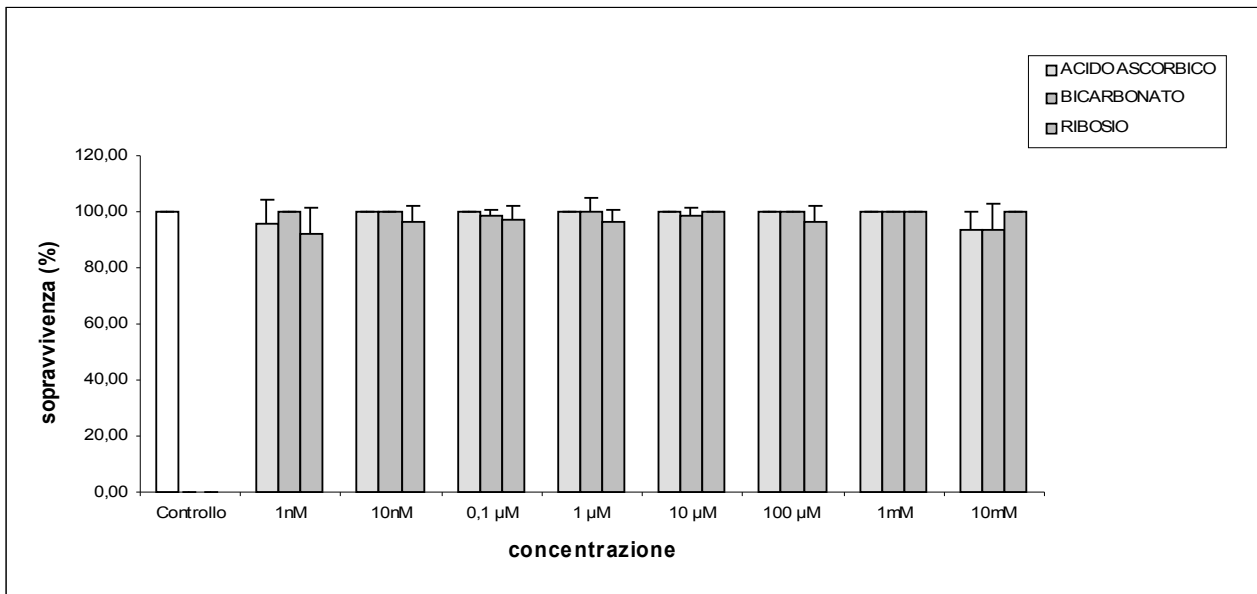


Fig 1: Effetto dell'acido ascorbico, del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla sopravvivenza (%) in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

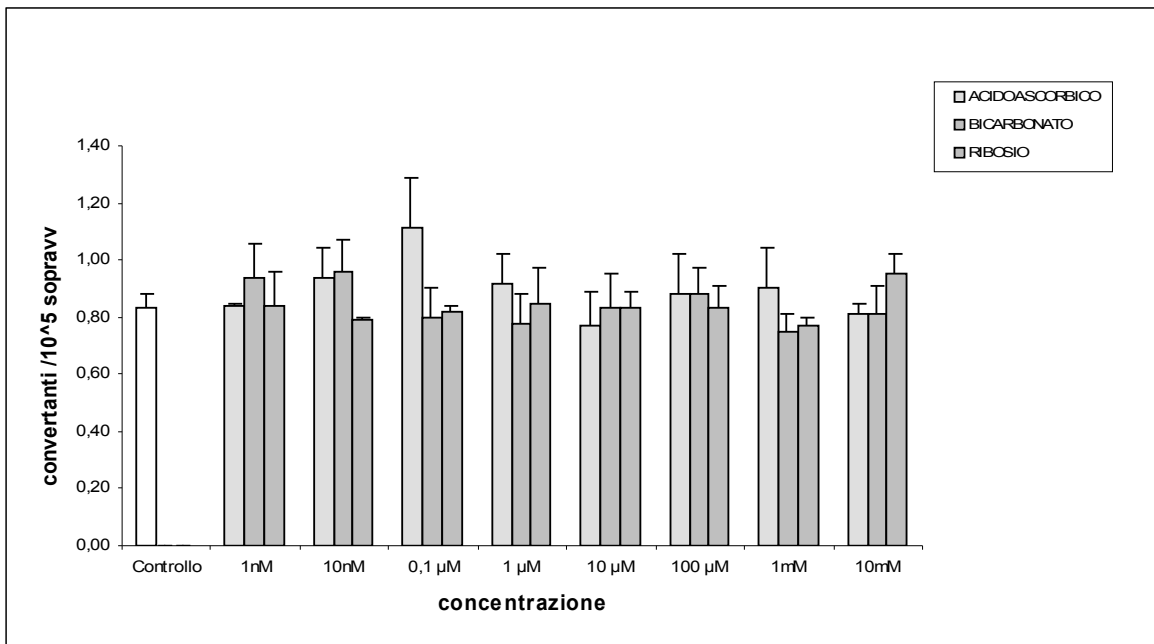


Fig 2: Effetto dell'acido ascorbico del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla conversione genica, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae* prelevate dalla fase stazionaria.

Il ribosio (10 mM) ha aumentato significativamente la frequenza di mutazione puntiforme rispetto al controllo (figura 3)

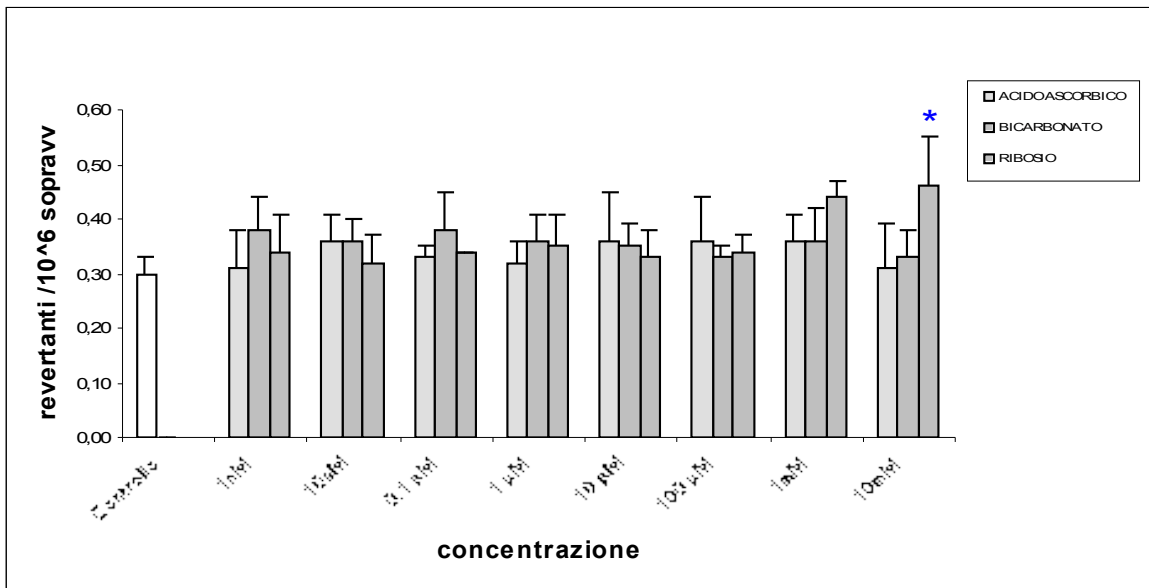


Fig 3: Effetto dell'acido ascorbico, del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla mutazione puntiforme, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

* aumento significativo rispetto al controllo

Crescita: incubazione per 48 ore in terreno a 30 °C (stazionaria)

Non è stato messo in evidenza alcun effetto sulla sopravvivenza e sulla conversione genica e sulla mutazione puntiforme a concentrazioni comprese tra 1 nM e 1mM (Figure 4,5,6)

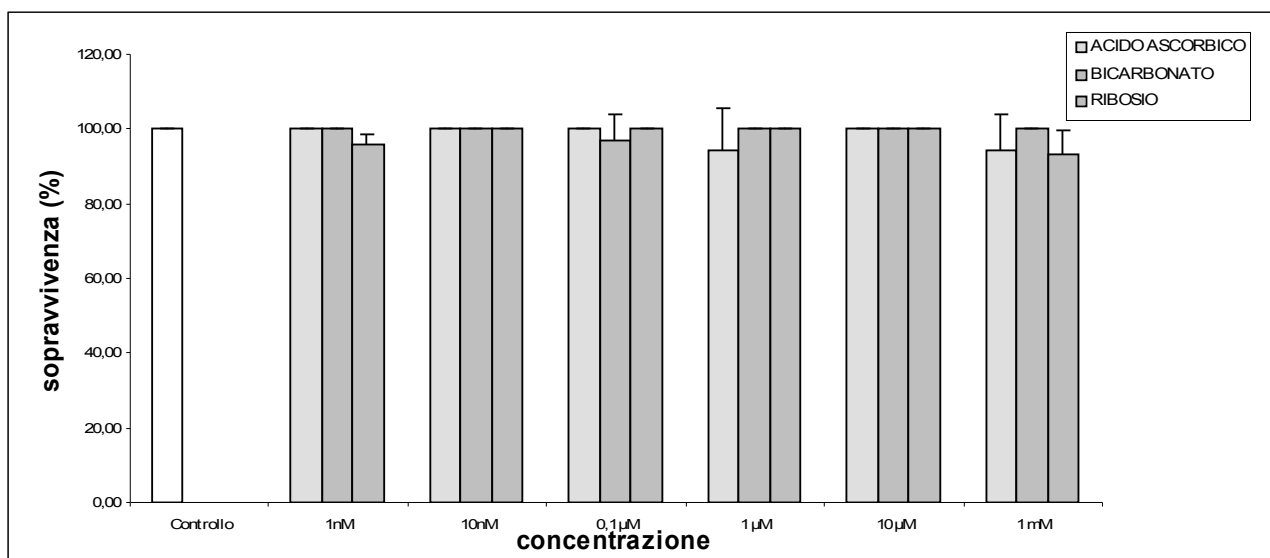


Fig 4: Effetto dell'acido ascorbico del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla sopravvivenza (%) in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

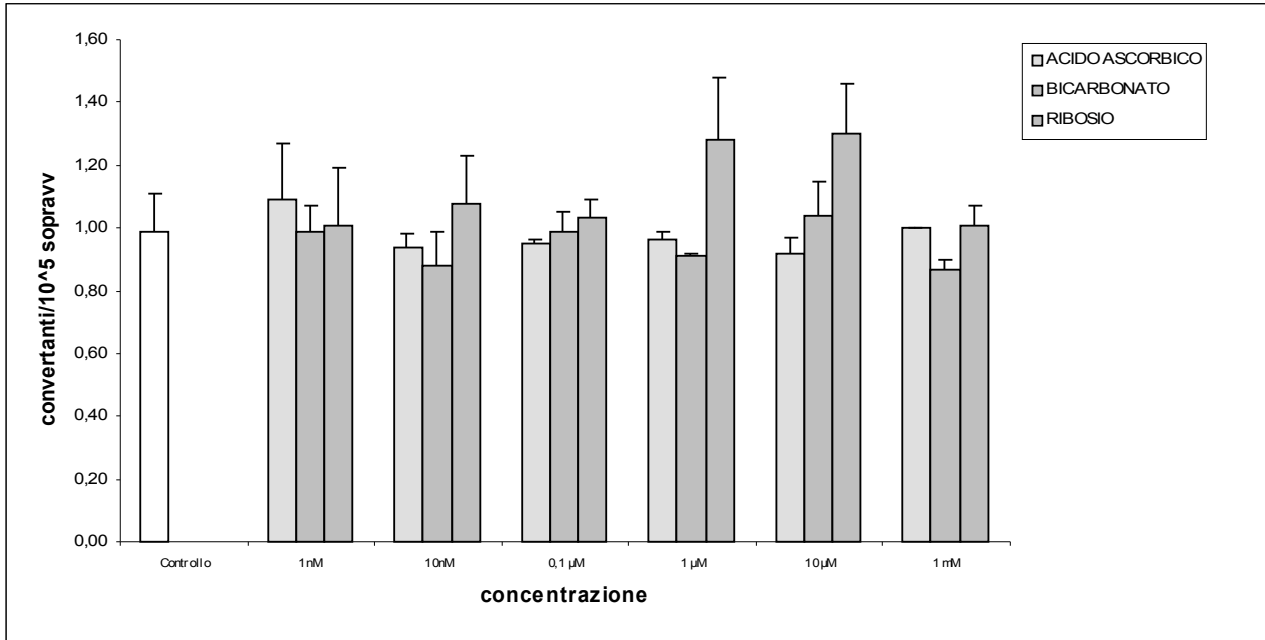


Fig 5: Effetto dell'acido ascorbico, del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla conversione genica, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

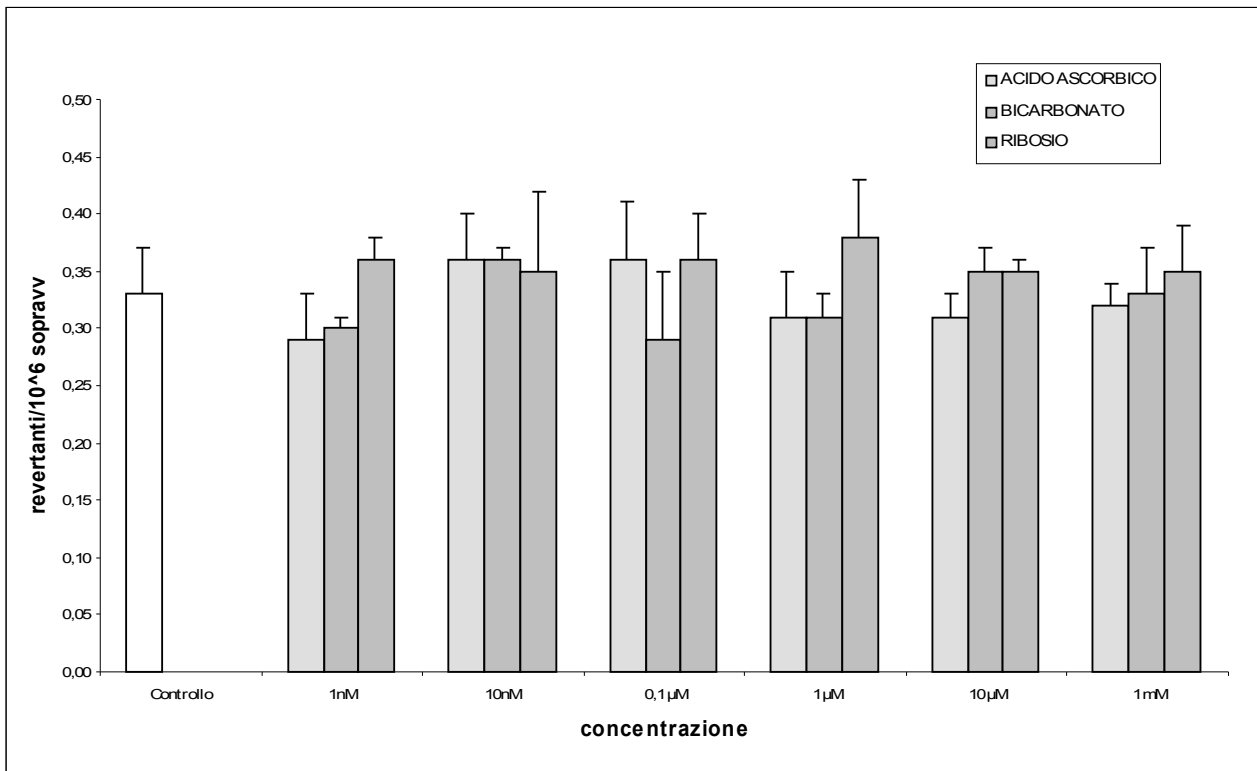


Fig 6: Effetto dell'acido ascorbico, del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla mutazione puntiforme, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria
Crescita: incubazione per 48 ore in terreno a 30 °C (stazionaria)

Le combinazioni non hanno influenzato la sopravvivenza e la mutazione puntiforme (figura 9,11);
La combinazione asc 1µM + + Kbic1 mM + rib 20 nM ha incrementato significativamente la frequenza di conversione genica (figura 10).

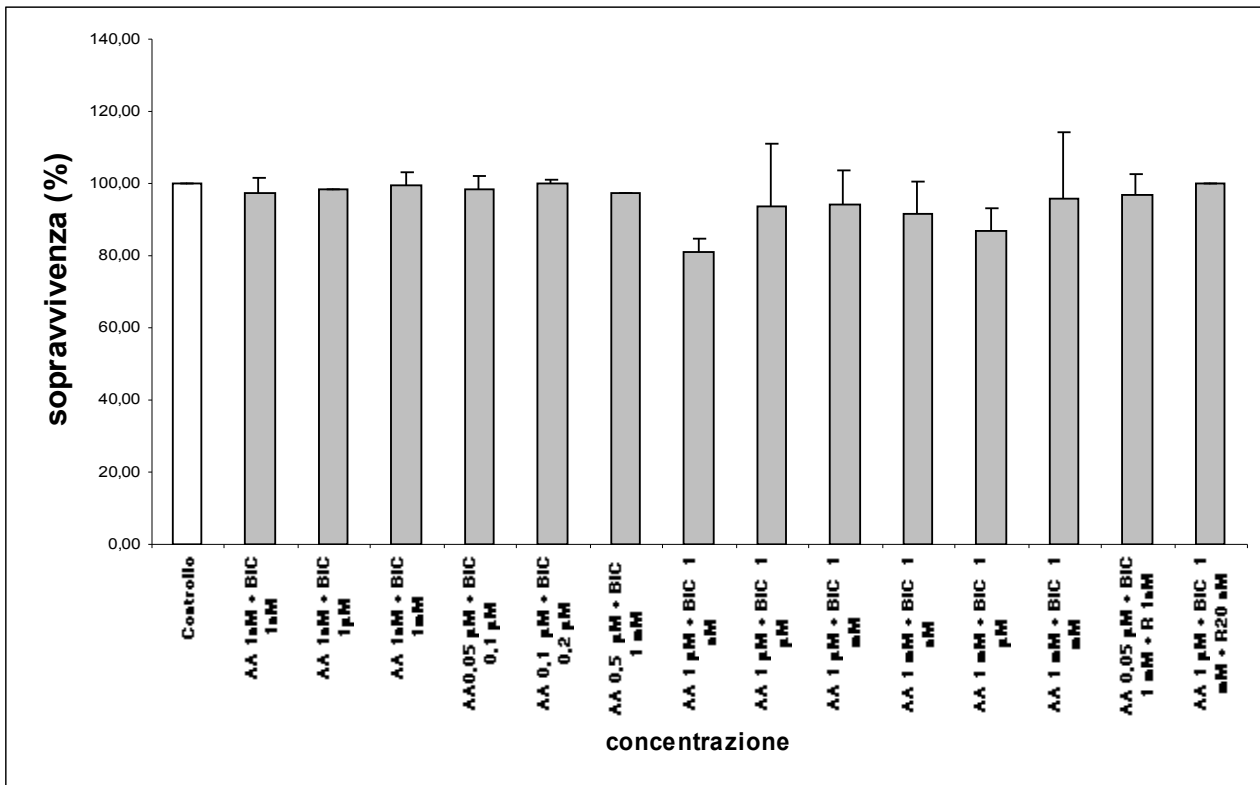


Fig 9: Effetto dell'acido ascorbico (Asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato di potassio (kbic), saggiati in combinazione, sulla sopravvivenza, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

Kbic 1nM+ rib 1 mM: non hanno avuto alcun effetto
 Kbic 1mM+ rib 1 nM: non hanno avuto alcun effetto

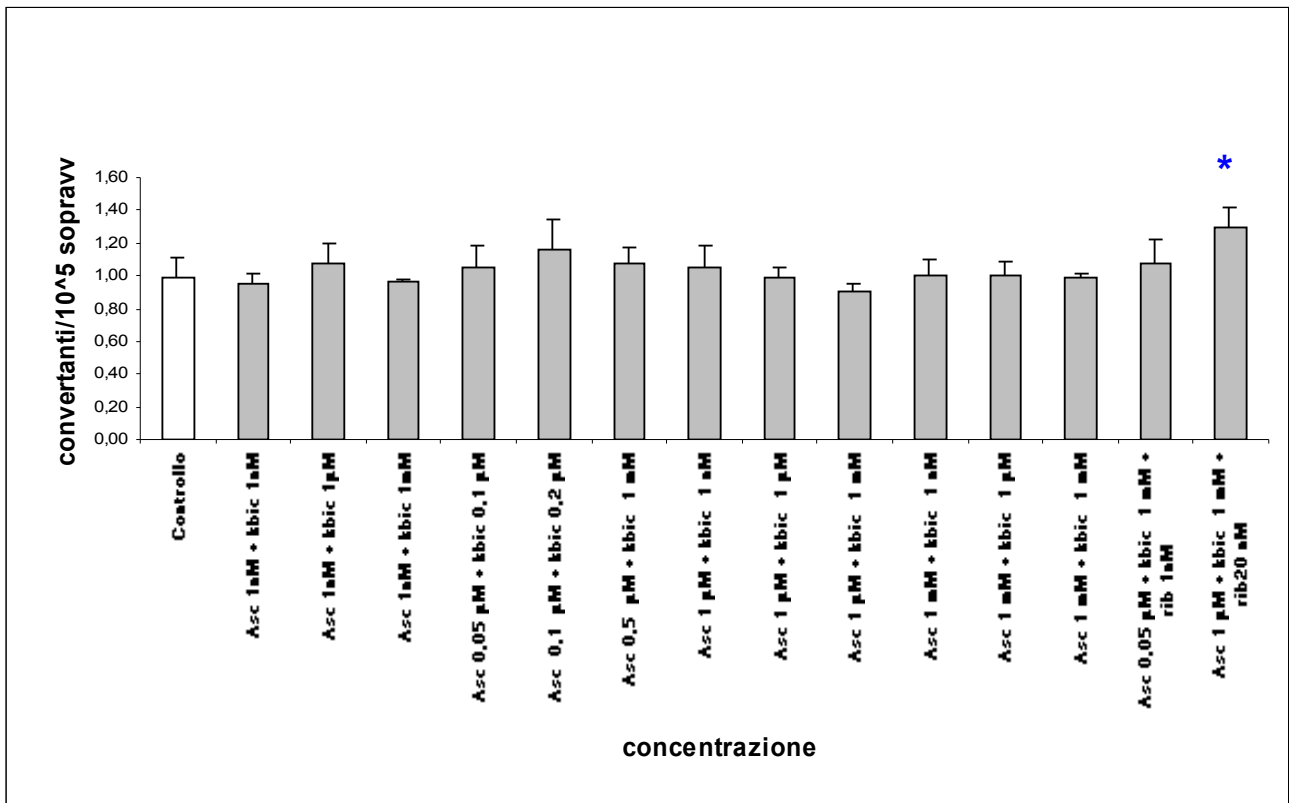


Fig 10: Effetto dell'acido ascorbico (Asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato di potassio (kbic), saggiati in combinazione, sulla conversione genica, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

Kbic 1mM+ rib 1 mM: non hanno avuto alcun effetto

Kbic 1mM+ rib 1 nM: non hanno avuto alcun effetto

* Aumento significativo rispetto al controllo

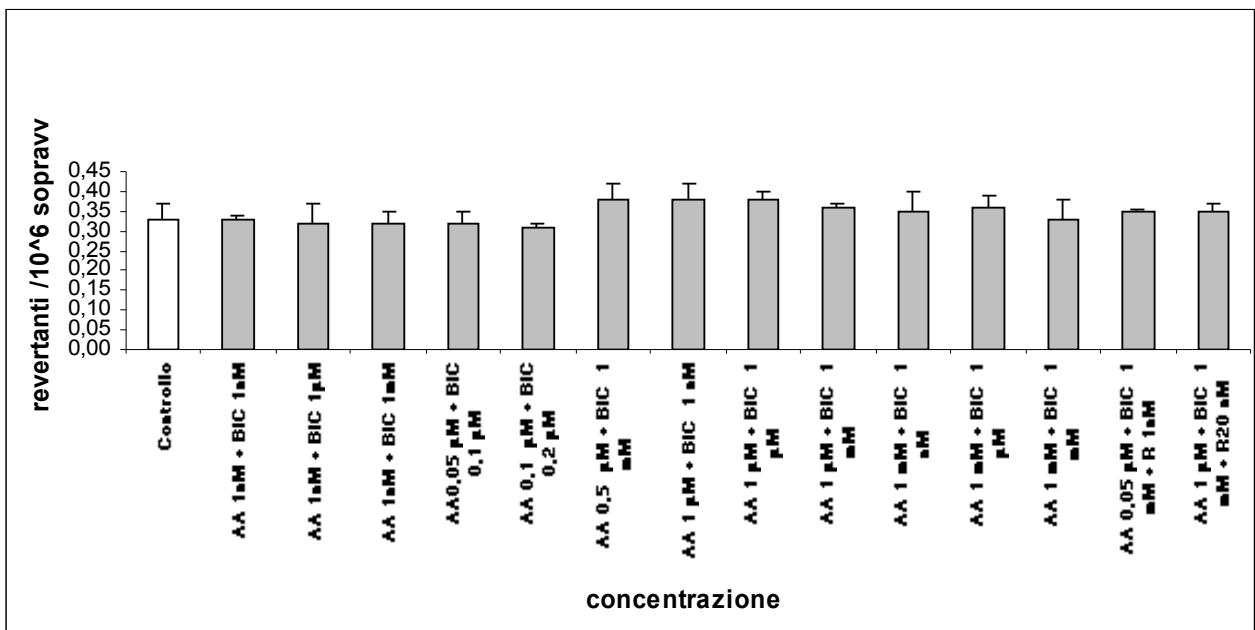


Fig 11: Effetto dell'acido ascorbico (Asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato di potassio (kbic), saggiati in combinazione, sulla mutazione puntiforme, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

Kbic 1nM+ rib 1 mM: non hanno avuto alcun effetto

Kbic 1mM+ rib 1 nM: non hanno avuto alcun effetto

ESPERIMENTI DI ANTIMUTAGENESI

Crescita: incubazione per 2 ore in terreno a 30 °C

L'acqua ossigenata non avuto alcun effetto sulla percentuale di sopravvivenza, mentre ha aumentato di circa 10 volte sia la conversione genica che la mutazione puntiforme. La combinazione asc 3 nM+bic. 6nM+ rib.0,06 nM ha diminuito significativamente la frequenza di mutazione puntiforme indotta dall'acqua ossigenata (tabella 6)

	Sopravvivenza	CG	MP
	%	conv/10 ⁵ sop	rev/10 ⁶ sop
Controllo	100	1,58 ± 0,20	0,53 ± 0,09
H ₂ O ₂ 200 mM	88,00 ± 13,50	15,63 ± 1,40 **	5,23 ± 0,61 **
+ asc 3 nM+kbic 6nM	94,00 ± 7,39	13,40 ± 1,78	5,32 ± 0,45
+ kbic 6nM+rib. 2nM	83,33 ± 8,50	15,02 ± 0,67	5,79 ± 0,88
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,18nM	82,00 ± 14,93	15,36 ± 1,11	4,73 ± 0,69
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,45nM	100	14,39 ± 0,49	5,44 ± 0,53
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,06nM	100	16,65 ± 0,39	2,57 ± 0,42 *
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,1nM	100	16,79 ± 0,40	5,04 ± 0,16
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,2nM	85,50 ± 0,53	15,05 ± 1,03	5,48 ± 1,00

Tab 6 : Effetto dell'acido ascorbico (asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato di potassio (Kbic), saggiati in combinazione, sulla sopravvivenza, sulla conversione genica (CG) e la mutazione puntiforme (MP) in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, con test in crescita (terreno 2%), trattate per 2 h con acqua ossigenata e composti

*: diminuzione rispetto al controllo positivo

** : aumento rispetto al controllo

Crescita: incubazione per 0,5 ore in terreno a 30 °C

L'acqua ossigenata non ha avuto alcun effetto sulla percentuale di sopravvivenza, mentre ha aumentato di circa 7 volte sia la conversione genica mentre non ha avuto effetto sulla mutazione puntiforme. Le combinazioni. asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,2nM e asc 3 nM+kbic 6nM hanno diminuito significativamente la conversione genica indotta dall'acqua ossigenata (tabella 7)

	Sopravvivenza	CG	MP
	%	conv/10 ⁵ sop	rev/10 ⁶ sop
Controllo	100	1,33 ± 0,19	0,44 ± 0,06
H ₂ O ₂ 25 mM	98,5 ± 3,67	10,34 ± 0,86 **	0,51 ± 0,03
+ asc 3 nM+kbic 6nM	98,00 ± 3,37	5,30 ± 1,29*	0,50 ± 0,03
+ kbic 6nM+rib. 2nM	93,00 ± 8,89	9,90 ± 0,56	0,51 ± 0,03
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,18nM	97,00 ± 3,46	10,16 ± 0,53	0,54 ± 0,04
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,45nM	100	10,16 ± 0,61	0,54 ± 0,05
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,06nM	92,67 ± 12,70	10,67 ± 0,69	0,52 ± 0,06
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,1nM	96,00 ± 6,93	10,36 ± 0,91	0,49 ± 0,05
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,2nM	97,25 ± 5,50	7,33 ± 0,17 *	0,46 ± 0,06

Tab 7: Effetto dell'acido ascorbico (asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato di potassio (Kbic), saggiati in combinazione, sulla sopravvivenza, sulla conversione genica (CG) e la mutazione puntiforme (MP) in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, con test in crescita (terreno 2%), trattate per 0,5 h con acqua ossigenata e composti.

*: diminuzione rispetto al controllo positivo

**: aumento rispetto al controllo

Ceppi EG

Test delle generazioni: incubazione overnight a 30°C

EG 103: il perossido d'idrogeno 5 mM ha ridotto significativamente il numero di generazioni; rib 1 nM e la combinazione asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM hanno recuperato significativamente la diminuzione (tabella 8).

EG 103	Generazioni
Controllo	2,18 ± 0,23
asc. 1 Nm	2,41 ± 0,04
asc. 10 nM	2,43 ± 0,08
rib. 1 nM	1,92 ± 0,30
rib. 10 nM	2,10 ± 0,06
kbic. 1 nM	2,15 ± 0,18
kbic. 10 nM	2,11 ± 0,10
H ₂ O ₂ 5 mM	citotox *
asc. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
asc. 10 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
rib. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	1,63 ± 0,34**
rib. 10 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
kbic. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
kbic. 10 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
asc. 1 nM + kbic. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
rib. 1 nM + kbic. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
asc. 1 nM + rib. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
asc. 1 nM + kbic. 1 nM	2,06 ± 0,04
rib. 1 nM + kbic. 1 nM	2,19 ± 0,13
asc. 1 nM + rib. 1 nM	1,99 ± 0,13
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM	2,11 ± 0,07
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	0,71 ± 0,08**

Tab 8: Effetto dell'acido ascorbico (asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato (kbic), saggiati singolarmente ed in combinazione, sul numero di generazioni compiute dal ceppo di lievito *Saccharomyces cerevisiae* EG 103 (wild type) dopo una incubazione overnight con le sostanze.

** : aumento rispetto al controllo positivo

* : diminuzione rispetto al controllo

EG 118: il perossido d'idrogeno 4 mM ha ridotto significativamente il numero di generazioni; la combinazione asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM è stata in grado di recuperare in modo significativo la diminuzione (tabella 10)

EG 118	Generazioni
Controllo	2,81 ± 0,30
H ₂ O ₂ 4 mM	0,47 ± 0,04*
asc. 10 nM + kbic. 10 nM + H ₂ O ₂ 4 mM	0,45 ± 0,03
asc. 10 nM + kbic. 10 nM	3,12 ± 0,05
rib. 10 nM + kbic. 10 nM + H ₂ O ₂ 4 mM	0,48 ± 0,03
asc. 10 nM + rib. 10 nM + H ₂ O ₂ 4 mM	0,50 ± 0,02
rib. 10 nM + kbic. 10 nM	3,10 ± 0,08
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM	2,81 ± 0,22
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM + H ₂ O ₂ 4 mM	0,80 ± 0,12 **

Tab 10: Effetto dell'acido ascorbico (asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato (bic), saggiati in combinazione, sul numero di generazioni compiute dal ceppo di lievito *Saccharomyces cerevisiae* EG 118 (mutante SOD citoplasmatica) dopo una incubazione overnight con le sostanze.

*: diminuzione rispetto al controllo

** : aumento rispetto al controllo positivo

EG 133: il perossido d'idrogeno 3 mM ha ridotto significativamente il numero di generazioni; la combinazione asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM è in grado di recuperare in modo significativo la diminuzione (tabella 11)

EG 133	Generazioni
Controllo	2,71 ± 0,05
H ₂ O ₂ 3 mM	Citotox *
asc. 1 nM + kbic. 1 nM	2,58 ± 0,02
asc. 1 nM + kbic. 1 nM + rib. 1 nM	2,69 ± 0,04
asc. 1 nM + rib. 1 nM	2,71 ± 0,01
rib. 1 nM + kbic. 1 nM	2,74 ± 0,02
asc. 1 nM + kbic. 1 nM + H ₂ O ₂ 3 mM	citotox
rib. 1 nM + kbic. 1 nM + H ₂ O ₂ 3 mM	citotox
asc. 1 nM + rib. 1 nM + H ₂ O ₂ 3 mM	citotox

asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM	2,81 ± 0,08
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM + H ₂ O ₂ 3 mM	1,22 ± 0,23 **

Tab 11: Effetto dell'acido ascorbico (asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato (kbic), saggiati in combinazione, sul numero di generazioni compiute dal ceppo di lievito *Saccharomyces cerevisiae* EG 133 (doppio mutante) dopo una incubazione overnight con le sostanze.

*: diminuzione rispetto al controllo

** : aumento rispetto al controllo positivo

CONCLUSIONI

In questo lavoro ci siamo proposti di indagare gli effetti genotossici ed eventualmente antimutageni dei composti:

- ascorbato di potassio
- ascorbato di potassio con ribosio

utilizzando il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, che costituisce, come già ripetuto durante il corso della relazione, un modello genetico rapido e poco dispendioso per cercare di individuare i potenziali effetti tossici di determinate sostanze. I risultati ottenuti indicano che:

i componenti acido L-ascorbico e bicarbonato di potassio non sono risultati genotossici e mutageni in esperimenti in sospensione;

l'ascorbato di potassio non è citotossico e mutageno in tutto il range di concentrazioni saggiate e sulla base di questi dati, potrebbe anche avere effetti positivi su cellule che sono state danneggiate; l'ascorbato di potassio con ribosio al 2%, si è rivelata una combinazione con effetto protettivo, cioè in grado di proteggere le cellule dalla citotossicità causata dal perossido d'idrogeno, anche quando mancano entrambe le SOD.

Questi risultati dunque confermano le premesse del nostro studio, anche se saranno necessario ulteriori indagini per approfondire l'argomento ed identificare le potenziali caratteristiche antimutagene dei composti, anche a concentrazioni più elevate rispetto a quelle che sono state utilizzate in questo lavoro.

RINGRAZIAMENTI

Questa ricerca è stata svolta grazie al finanziamento della Fondazione Valsè Pantellini, per un Assegno di Ricerca conferito alla dott.ssa Clara Maria Della Croce, nell'ambito della collaborazione esistente tra la suddetta Fondazione e *l'Istituto di Mutagenesi e Differenziamento (CNR) di Pisa.

*Durante l'anno 2002 il personale dell'Istituto di Mutagenesi e Differenziamento (CNR) di Pisa, a causa del processo di riorganizzazione del CNR, è afferrito ad altri organismi del CNR, tra cui l'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA).