

EFFETTI DELLA SUPPLEMENTAZIONE CON PROBIOTICI SULL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE PLASMATICA IN CALCIATORI DI ÉLITE

J. FUSI¹, F. GUAGNINI², D. ARCURI³, E. CERRI¹, F. FASSIO⁴, A. PETROCCHI¹, R. BANDUCCI¹, F. GALETTA¹, F. FRANZONI¹

¹ Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa, Pisa, Italia

² Allergy Therapeutics Italia, Settimo Milanese (MI), Italia

³ Usd Scalea Calcio 1912, Scalea (CS), Italia

⁴ Unità di Medicina Interna, ASL 3 Pistoia (PT), Italia

RIASSUNTO

Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto di una miscela di *Bifidobacterium breve* BR03 (DSM 16604) e *Bifidobacterium lactis* BS05 (DSM 23032) sullo stress ossidativo in atleti di élite. Venti atleti sono stati selezionati per lo studio. Dieci atleti hanno consumato una dose giornaliera dei due ceppi probiotici per 16 settimane. Gli altri 10 atleti hanno formato il gruppo di controllo. Campioni di sangue sono stati raccolti immediatamente prima e dopo il periodo di supplementazione. Sono stati analizzati tramite d-ROMS Test i livelli plasmatici di metaboliti reattivi dell'ossigeno. È stata determinata in vitro l'attività antiossidante dei due ceppi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'attività fisica intensa induce stress ossidativo e che la supplementazione con probiotici riduce i livelli plasmatici di metaboliti dell'ossidazione. I ceppi probiotici *Bifidobacterium breve* BR03 (DSM 16604) e *Bifidobacterium lactis* BS05 (DSM 23032) esercitano una forte attività antiossidante. Gli atleti di élite e tutti quelli esposti allo stress ossidativo possono beneficiare della capacità di questi probiotici di neutralizzare gli effetti dei radicali liberi.

Parole chiave: Attività fisica · Fermenti probiotici · Radicali liberi dell'ossigeno

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effect of a mixture of *Bifidobacterium breve* BR03 (DSM 16604) and *Bifidobacterium lactis* BS05 (DSM 23032) on oxidative stress in elite athletes. Twenty athletes were selected for the study. Ten athletes consumed a daily dose of a blend of the two probiotic strains for 16 weeks. Ten athletes formed the control group. Blood samples were harvested immediately before and after the supplementation period. The d-ROMS Test was used to evaluate the plasma levels of oxygen-responsive metabolites. The antioxidant activity of the two strains was determined in vitro. The results obtained showed that intense physical activity induces oxidative stress and that supplementation with probiotics reduces the plasma levels of oxidation metabolites. The probiotic strains *Bifidobacterium breve* BR03 (DSM 16604) and *Bifidobacterium lactis* BS05 (DSM 23032) exert a strong antioxidant activity. Elite athletes and all those exposed to oxidative stress may benefit from the ability of these probiotics to neutralize the effects of free radicals.

Key words: Physical activity · Probiotics · Free radicals

INTRODUZIONE

Lo stress ossidativo è determinato da uno squilibrio tra produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e difese antiossidanti. Esso sembra essere implicato in varie condizioni patologiche come le

malattie cardiache¹, le malattie neuro-degenerative^{2,3}, l'aterosclerosi⁴ e l'invecchiamento⁵. Poiché gli esseri umani usano l'ossigeno per produrre energia dal cibo, la produzione di ROS e dei loro metaboliti è un normale risultato delle vie biochimiche. Per neutralizzare i ROS, il nostro organismo

possiede numerosi enzimi che, insieme con gli antiossidanti contenuti negli alimenti, formano una barriera antiossidante biologica. A causa dell'intensa attività fisica e dell'aumentato consumo di ossigeno, gli atleti sono particolarmente esposti ad un eccesso di ROS. Una singola sessione di esercizio fisico intenso è sufficiente a produrre quantità significative di ROS⁶. Nell'esercizio prolungato, la produzione di ROS è ancora più elevata e può provocare danno ossidativo⁷.

I fermenti probiotici, commercialmente disponibili in forma di capsule, in polvere o in latticini selezionati come latte fermentato o yogurt, sono considerati degli ottimi supplementi utili per l'equilibrio del microbiota umano⁸. Negli ultimi anni, diversi studi hanno evidenziato i potenziali benefici per la salute dei probiotici, come la stimolazione del sistema immunitario, l'attività antitumorale e la riduzione dello stress ossidativo. Alcuni studi hanno esplorato le proprietà antiossidanti dei probiotici, ma solo su un numero limitato di ceppi. Questi studi hanno indicato che alcuni ceppi specifici di probiotici esercitano attività antiossidante e possono essere utili nel ridurre lo stress ossidativo sistemico attraverso diversi meccanismi⁹⁻¹⁷. L'espressione di alti livelli di enzimi antiossidanti può neutralizzare sostanze pro-ossidanti direttamente nel tratto intestinale¹². Inoltre, la stimolazione del sistema immunitario riduce l'infiammazione e previene le citochine indotte dallo stress ossidativo¹⁷. Infine, i probiotici sembrano anche aumentare l'assorbimento di macro e micronutrienti ad azione antiossidante¹².

Per la loro vasta gamma di effetti, i probiotici potrebbero rappresentare un'integrazione efficace per gli atleti per potenziare la barriera antiossidante e per prevenire pericolosi livelli di stress ossidativo. Per testare questa ipotesi, lo scopo del nostro lavoro è stato quello di testare *in vitro* la capacità *scavenger* di alcuni ceppi probiotici e, successivamente, di valutarne gli effetti *in vivo* sulla capacità antiossidante plasmatica in atleti di élite.

MATERIALE E METODI

Campioni studiati

I probiotici utilizzati in questo studio sono stati forniti da Allergy Therapeutics Italia, Settimo Milanese, Italia. Il prodotto studiato è una polvere costituita da una miscela di due ceppi probioti-

ci liofilizzati: *Bifidobacterium breve* BR03 (DSM 16604) ($5 \cdot 10^9$ UFC) e *Bifidobacterium lactis* BS05 (DSM 23032) ($5 \cdot 10^9$ UFC). Per il saggio, un'aliquota del composto è stata sciolta in acqua sterile e la soluzione è stata diluita a concentrazioni desiderate immediatamente prima dell'uso. La capacità antiossidante del composto è stata ottenuta analizzando la soluzione a partire da un'aliquota di 100 mM e utilizzando diverse diluizioni (1-50 mM). L'acido α -cheto- γ -metiol-butirrico (KMBA), il glutatione ridotto (GSH), il 2,2'-azo-bis-amidino-propano (ABAP) e l'acido dietilen-triamino-pentacetico (DTPA) sono stati acquistati da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Soggetti

Venti calciatori (età media 28.2 ± 5.5 anni) selezionati dalla rosa dello Scalea Calcio 1912, sono stati reclutati per lo studio (Scalea Power Lab). Lo studio si è svolto tra Agosto e Gennaio. In questo periodo gli atleti praticavano 4 sedute di allenamento alla settimana per un totale di circa 7 ore, oltre alla partita settimanale del campionato di Eccellenza regionale calabrese 2014-2015. Tutti i soggetti erano sani ed esenti dai principali fattori di rischio cardiovascolare sulla base di un'accurata anamnesi, una visita clinica completa e un ECG basale e da sforzo. Nessuno era fumatore o assumeva farmaci o qualsiasi tipo di supplementazione vitaminica. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico di Area Vasta Nord Ovest (CEAVNO) per la Sperimentazione clinica e tutti i soggetti hanno firmato consenso scritto all'esecuzione dello studio (271/2014).

Procedura sperimentale

Gli atleti sono stati distribuiti a caso in due gruppi: un gruppo di controllo (10 soggetti) e un gruppo probiotico (10 soggetti). Lo studio è stato eseguito in modo parallelo, con 2 settimane di run-in seguito da un periodo di intervento di 16 settimane, dall'inizio della preparazione pre-campionato, fino alla pausa invernale. Durante il periodo di intervento, i soggetti appartenenti al gruppo probiotico si sottoponevano a supplementazione giornaliera con un simbiotico a base di 10 miliardi di ceppi probiotici di *Bifidobacterium breve* BR03 (DSM 16604) e *Bifidobacterium lactis* BS05 (DSM 23032), selenito di sodio (Na_2SeO_3) 62 μg , frutto

oligosaccaridi 2500 mg e maltodestrina 4000 mg (Atiplus Power®, prodotto da Probiotal Novara Italia e commercializzato da Allergy Therapeutics Italia, Settimo Milanese). Nel corso dello studio, tutti gli atleti hanno seguito lo stesso programma di allenamento fisico e una dieta individuale bilanciata. Al reclutamento e alla fine dello studio, tutti i soggetti erano sottoposti a prelievo ematico per le analisi chimico-fisiche di routine e per la valutazione dello stress ossidativo plasmatico. Dopo incannulamento della vena antecubitale, i soggetti erano sottoposti a prelievo ematico (50 ml) in condizioni ambientali controllate (temperatura di 22-24°C), a distanza di almeno 48h dall'ultimo impegno sportivo. L'attività antiossidante dei ceppi probiotici è stata inoltre valutata *in vitro*.

Valutazione *in vitro* della capacità antiossidante dei probiotici

La valutazione della capacità antiossidante dei ceppi di *Bifidobacterium* è stata testata *in vitro* mediante saggio TOSCA (*Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay*)¹⁸ e confrontata con quella del GSH. In breve, il saggio si basa sulla genesi artificiale di radicali perossilici prodotti a 35°C dalla omolisi termica dell'ABAP in un tampone di fosfato di potassio 100 mM (pH 7,4) con 0,1 mM di DTPA. Le reazioni con KMBA 0,2 mM sono state effettuate in vials da 10 ml sigillate con valvole a tenuta di gas Mininert® (Supelco, Bellefonte, PA) in un volume finale di 1 ml. La produzione di etilene è stata misurata tramite analisi gascromatografica di un aliquota di 200 µl presa dallo spazio di testa dei vials a intervalli di tempo regolari durante tutta la durata della corsa. L'analisi è stata effettuata con un gascromatografo Hewlett-Packard (HP 7820A Series, Andover, MA) equipaggiato con una colonna capillare Supelco DB-1 (30 × 0,32 × 0,25 mm) e un detector ionizzatore di fiamma (FID). Le temperature del forno, dell'iniettore e del FID erano rispettivamente 35, 160 e 220 °C. Come gas *carrier* è stato usato l'idrogeno (a un flusso di 1 ml/min). I valori TOSCA sono stati calcolati dall'equazione: $TOSCA = 100 - (JSA/JCA \times 100)$, dove JSA e JCA rappresentano gli integrali delle aree per il campione e la reazione di controllo, rispettivamente. I risultati sono stati espressi in unità TOSCA per µg di campione. Un valore TOSCA di 0 corrisponde ad un campione senza capacità *scavenger* (nes-

suna inibizione della formazione di etilene rispetto alla reazione di controllo, $JSA/JCA = 1$), mentre un valore TOSCA di 100 corrisponde alla massima efficienza del campione analizzato.

Determinazione dei metaboliti reattivi dell'ossigeno

La valutazione dello stress ossidativo è stata effettuata mediante d-ROMs test¹⁹. Brevemente, il d-ROMs test misura la capacità "ossidante" di un campione di plasma nei confronti di una particolare sostanza (un'ammina aromatica modificata) usata come indicatore (cromogeno). Il fenomeno si associa al graduale e progressivo viraggio verso il rosa della miscela di reazione (plasma + cromogeno), dapprima incolore. La variazione cromatica è misurata attraverso un fotometro che converte in un "numero" la capacità ossidante così determinata. I valori sono espressi in Unità Carratelli (U CARR). Contribuiscono a determinare la capacità ossidante misurata dal d-ROMs Test soprattutto i radicali alcossilici e idroperossilici, derivati dagli idroperossidi (ROOH). Nei soggetti sani, il d-ROMs Test assume un valore compreso fra 200 e 300 U CARR, che ne rappresenta anche l'intervallo o range di normalità. Valori superiori a 300 U CARR sono indicativi di una condizione di stress ossidativo.

Statistica

I risultati sono stati espressi come media ± deviazione standard. Le differenze tra le due popolazioni sono state valutate con il test t di Student. Le differenze sono state considerate statisticamente significative quando $p < 0.05$. Per valutare eventuali correlazioni tra le variabili è stata utilizzata la regressione lineare con analisi univariata e multivariata.

RISULTATI

L'analisi *in vitro* della capacità antiossidante dei ceppi di *Bifidobacterium* è raffigurata nella figura 1. I campioni studiati hanno mostrato un'ottima attività antiossidante verso i radicali perossilici con un valore TOSCA di 2.61 Unità/µg, sovrapponibile alla capacità *scavenger* dell'antiossidante di riferimento GSH (2.73 Unità/µg).

Nella tabella 1 sono riportate le caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti reclutati nello studio. Come atteso, nessuna differenza significativa era presente tra i due gruppi.

Riguardo alla valutazione dello stress ossidativo, i valori espressi basalmente tra i due gruppi al d-ROMs Test risultavano sovrapponibili (254.33 ± 19.41 vs 216.00 ± 24.08 U CARR, n.s.). Come atteso, dopo 4 mesi di attività agonistica intensa, in entrambi i gruppi studiati si evidenziava un incremento nella produzione dei metaboliti dell'ossigeno (261.17 ± 14.78 e 300.75 ± 39.61 U CARR, rispettivamente), ma tale incremento era significativamente meno evidente nel gruppo trattato con supplementazione probiotica rispetto al gruppo di controllo (figura 2). La produzione di metaboliti dell'ossigeno risultava infatti aumentata del 40% circa dall'attività fisica nel gruppo

di controllo, a fronte di un aumento relativamente modesto (circa 3%) nei soggetti trattati con supplementazione probiotica. L'assunzione di Atiplus Power era in grado di inibire del 13.1% la produzione totale di radicali liberi negli atleti trattati.

DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio dimostrano che i *Bifidobacterium breve BR03* (DSM 16604) e *Bifidobacterium lactis BS05* (DSM 23032) hanno capacità *scavenger* verso i radicali perossilici e che la loro regolare supplementazione è in grado di contrastare la produzione di radicali liberi indotta dall'attività sportiva agonistica in giovani calciatori.

Tab. 1 - Caratteristiche cliniche della popolazione studiata (mean±SD).

	Gruppo probiotici n=10	Gruppo controllo n=10
Età (anni)	27.8±4.6	28.4±5.1
BMI (kg/m ²)	23.1±1.2	23.4±0.7
Frequenza cardiaca (bpm)	48.4±3.6	47.9±4.2
PAS (mmHg)	116.3±4.5	115.4±4.3
PAD (mmHg)	72.3±7.6	73.5±3.1
Glucosio (mmol/L)	5.1±0.4	5.0±0.7
Colesterolo totale (mmol/L)	4.51±1.15	4.32±0.52
Colesterolo HDL (mmol/L)	1.36±0.31	1.4±0.24
Colesterolo LDL (mmol/L)	2.82±0.32	2.77±0.5

BMI = body mass index; PAS = pressione arteriosa sistolica; DBP = pressione arteriosa diastolica.

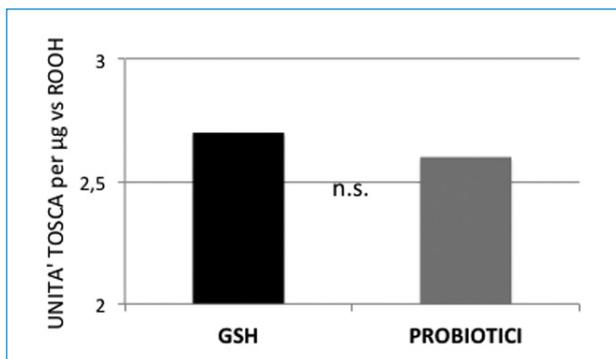


Fig. 1 - Confronto dell'attività antiossidante in vitro dei probiotici *Bifidobacterium breve BR03* e *Bifidobacterium lactis BS05* verso i radicali perossilici (ROOH) rispetto al glutatione ridotto (GSH).

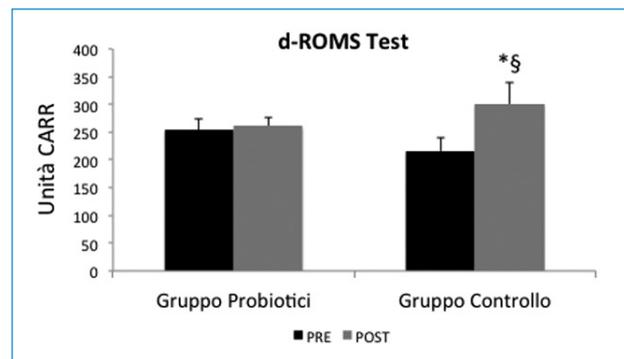


Fig. 2 - Analisi dei livelli plasmatici di metaboliti ossidativi mediante d-ROMs Test nei due gruppi studiati all'inizio (PRE) e alla fine (POST) del periodo di osservazione. * = $p < 0.01$ verso basale, § = $p < 0.01$ verso POST gruppo probiotici.

L'attività fisica regolare, oltre a combattere l'insorgere di patologie connesse ad uno stile di vita sedentario, è in grado di contrastare lo stress ossidativo che è la causa di numerose manifestazioni patologiche. Infatti, numerosi studi hanno evidenziato come l'esercizio fisico moderato induca una *up-regulation* dei sistemi antiossidanti²⁰. Di contro, però, l'attività fisica strenua si associa ad una grande produzione di radicali liberi in grado di superare le difese antiossidanti e determinare alterazioni dell'integrità cellulare²¹. Per tale motivo, è sempre più comune nella pratica sportiva assumere sostanze antiossidanti con lo scopo di prevenire o ridurre il danno ossidativo.

Negli ultimi anni, prebiotici, probiotici e simbiotici sono diventati popolari integratori alimentari a causa dei loro effetti benefici sulla salute umana. Questi prodotti migliorano l'ambiente microbico del tratto gastro-intestinale ed esercitano diversi effetti positivi, che vanno dalla esclusione competitiva dei patogeni alla stimolazione del sistema immunitario. I probiotici hanno un notevole impatto anche sul metabolismo dell'ospite, in quanto producono vitamine e partecipano alla lavorazione di sostanze nutritive. Nel caso di diete inadeguate, patologie metaboliche e terapie antibiotiche, l'uso dei probiotici può rappresentare una strategia efficace e talvolta necessaria per evitare carenze di vitamine antiossidanti e altri nutrienti preziosi. Diversi studi hanno dimostrato che alcuni ceppi di probiotici riducono lo stress ossidativo negli esseri umani, attraverso la loro attività antiossidante diretta, migliorano la digestione e l'assorbimento di vitamine e modulano il sistema immunitario⁹⁻¹⁷. Nicola et al.²² hanno caratterizzato i meccanismi immunologici responsabili dell'effetto immunomodulante ed anti-infiammatorio del *Bifidobacterium Breve BR03* (DSM16604). Dopo 5 giorni di incubazione di cellule mononucleate isolate da sangue periferico umano (PBMC) con *Bifidobacterium Breve BR03*, si è osservato un marcato e significativo incremento della proliferazione cellulare con una crescita significativa per la sottopopolazione linfocitaria T CD4+ (linfociti T helper). Per quanto riguarda l'effetto anti-infiammatorio, si è rilevato un significativo aumento di IL10 rispetto al controllo. Dati sperimentali hanno dimostrato che ceppi probiotici sono in grado di aumentare l'espressione di alcuni enzimi antiossidanti e neutralizzare le sostanze pro-ossidanti direttamente nel tratto intestinale¹⁰. Sembrano

anche aumentare l'assorbimento di macro e micronutrienti ad azione antiossidante¹². Uno studio sugli effetti antiossidanti del *Bifidobacterium*, ha dimostrato che questo ceppo possiede capacità *scavenger* grazie all'attività di riduzione della NAD-ossidasi e NAD-perossidasi¹⁴. Amaretti ha recentemente dimostrato l'attività antiossidante di 34 ceppi probiotici diversi *in vitro* (sette *Bifidobacterium*, undici *Lactobacillus*, sei *Lactococcus* e dieci *Streptococcus thermophilis*) e, successivamente, ne ha analizzato l'efficacia in vivo nel plasma di ratti dopo stress ossidativo indotto da doxorubicina. Tra tutti i ceppi esaminati, *Bifidobacterium Animalis Sub Lactis* e *Bifidobacterium brevis* si sono evidenziati per le spiccate capacità antiossidanti sia *in vitro* che *in vivo*. Questo studio dimostra come ceppi specifici di probiotici possono contribuire a ridurre lo stress ossidativo *in vitro* e limitare livelli eccessivi di radicali reattivi *in vivo*¹⁵. La capacità dei probiotici di indurre un miglioramento della risposta antiossidante a livello plasmatico è stata osservata anche nell'uomo da Martarelli¹⁶.

Nel nostro studio, per la prima volta è stata dimostrata in maniera diretta l'azione antiossidante *in vitro* del *Bifidobacterium* verso i radicali perossilici, specie altamente tossiche e responsabili della perossidazione lipidica. L'attività *scavenger* di questi ceppi probiotici verso tali specie di ROS è risultata inferiore a quella del GSH che, tuttavia, è considerato l'antiossidante di riferimento verso i radicali perossilici. La resistenza allo stress ossidativo è una misura della capacità dei batteri di sopravvivere in condizioni di ossidazione. Il *Bifidobacterium breve BR03* (DSM 16604) e il *Bifidobacterium lactis BS05* (DSM 23032) hanno mostrato un'alta resistenza allo stress ossidativo, confermando così la loro attività antiossidante.

Al di là dei risultati *in vitro* e perché l'ambiente intestinale è complesso, i dati *in vivo* sono essenziali per una corretta valutazione degli effetti dei probiotici. Nel nostro studio, un gruppo di calciatori di élite si è sottoposto ad un periodo di supplementazione alimentare con una miscela di fermenti probiotici e confrontato con un gruppo di controllo della stessa squadra, al fine di valutare gli effetti sulla concentrazione plasmatica dei metaboliti ossidativi. Dai risultati ottenuti si osserva come al termine del periodo di trattamento entrambi i gruppi presentavano una produzione dei metaboliti dell'ossigeno superiore

rispetto all'inizio della stagione agonistica, confermando che l'attività fisica intensa è in grado di aumentare in maniera significativa la produzione di radicali liberi. A differenza, però, del gruppo di controllo, il gruppo trattato con i probiotici mostrava una produzione di metaboliti dell'ossigeno significativamente inferiore. Presi insieme, questi dati dimostrano che l'attività fisica intensa induce stress ossidativo e che la supplementazione probiotica aumenta i livelli plasmatici di antiossidanti, neutralizzando così l'azione dei ROS e riducendo lo stress ossidativo. Questo effetto può essere estremamente importante per ridurre e rendere più efficace il tempo di recupero fra sessioni di attività fisica intensa, limitando anche gli eventuali infortuni causati da un non corretto recupero. In conclusione, i risultati dimostrano che i due ceppi di *Bifidobacterium breve* BR03 (DSM 16604) e *Bifidobacterium lactis* BS05 (DSM 23032) esercitano una forte attività antiossidante in situazioni di elevato stress fisico. Gli atleti di elite e tutti quelli esposti a stress ossidativo possono beneficiare della capacità di questi probiotici di aumentare i livelli di antiossidanti e neutralizzare gli effetti di specie reattive dell'ossigeno.

BIBLIOGRAFIA

- Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T., *Role of oxidative stress in cardiovascular diseases*, J Hypertens 2000; 18: 655-673.
- Jenner P., Olanow C.W., *Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease*, Neurology 1996; 47: S161-S170.
- Markesbery W.R., *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. Free Radic Biol Med 1997; 23: 134-147.
- Bonomini F., Tengattini S., Fabiano A., et al., *Atherosclerosis and oxidative stress*, Histo Histopathol 2008; 23: 381-390.
- Kregel K.C., Zhang H.J., *An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations*, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007; 292: R18-R36.
- Deaton C.M., Marlin D.J., *Exercise-associated oxidative stress*, Clin Tech Equine Prac 2003; 2: 278-291.
- Ilhan N., Kamanli A., Ozmerdivenli R., et al., *Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substance levels, and glucose concentration*, Arch Med Res 2004; 35: 294-300.
- Jacobsen C.N., Rosenfeldt Nielsen V., Hayford A.E., et al., *Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans*, Appl Environ Microbiol 1999; 65: 4949-4956.
- An H., Zhou H., Huang Y., et al., *High-level expression of heme-dependent catalase gene katA from Lactobacillus Sakei protects Lactobacillus rhamnosus from oxidative stress*, Mol Biotechnol 2010; 45: 155-160.
- Fabian E., Elmadfa I., *The effect of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on oxidant and anti-oxidant parameters in plasma of young healthy women*, Int J Vitam Nutr Res 2007; 77: 79-88.
- Kullisaar T., Songisepp E., Mikelsaar M., et al., *Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects*, Br J Nutr 2003; 90: 449-456.
- Lin M.Y., Chang F.J., *Antioxidative effect of intestinal bacteria Bifidobacterium longum ATCC 15708 and Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*, Dig Dis Sci 2000; 45: 1617-1622.
- Uskova M.A., Kravchenko L.V., *Antioxidant properties of lactic acid bacteria-probiotic and yogurt strains*, Vopr Pitan 2009; 78: 18-23.
- Shimamura S., Abe F., Ishibashi N., et al., *Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of Bifidobacterium species*, J Dairy Sci 1992; 75: 3296-3306.
- Amaretti A., Di Nunzio M., Pompei A., et al., *Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities*, Appl Microbiol Biotechnol 2013; 97: 809-817.
- Martarelli D., Verdenelli M.C., Scuri S., et al. *Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training*. Curr Microbiol 2011; 62: 1689-1696.
- Gallo A., Passaro G., Gasbarrini A., et al. *Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An update*. World J Gastroenterol 2016; 28; 22: 7186-202.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., et al., *A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids*, Free Radic Biol Med 1998; 24: 480-493.
- Nobuyuki M., Atsushi S., Syumpei H., et al., *Usefulness of the d-ROMs test for prediction of cardiovascular events*, International Journal of Cardiology 2016; 222: 226-232.
- Wang P., Li C.G., Qi Z., et al., *Acute exercise stress promotes Ref1/Nrf2 signalling and increases mitochondrial antioxidant activity in skeletal muscle*, Exp Physiol 2016; 101: 410-420.
- Lewis N.A., Howatson G., Morton K., et al., *Alterations in redox homeostasis in the elite endurance athlete*, Sports Med 2015; 45: 379-409.
- Nicola S., Mogna L., Alessina S., et al., *Interaction between probiotics and human immune cells. The prospective anti-inflammatory activity of Bifidobacterium breve BR03*, Supplement to Agro Food Industry hi-tech 2010; 21(2).

CORRISPONDENZA:

Ferdinando Franzoni
 Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa
 Via Roma 67, 56100 Pisa
 Tel.: +39 3483838842
 email: ferdinando.franzoni@unipi.it