RICERCHE E PUBBLICAZIONI



Citozeatec®
INTEGRATORI BIODINAMICI

RICERCHE E PUBBLICAZIONI - SOMMARIO

1.1	CARCINOMA POLMONARE - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 4**
1.2	CARCINOMA POLMONARE - Pubblicazione	**Pag. 9**
2.1	SCLEROSI MULTIPLA - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 12**
2.2	SCLEROSI MULTIPLA - Pubblicazione	**Pag. 17**
2.3	SCLEROSI MULTIPLA - Biochimica	**Pag. 18**
3.1	HCV - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 26**
3.2	HCV - Pubblicazione	**Pag. 30**
4.1	ICTUS ISCHEMICO - Ricerca Fondazione Santa Lucia	**Pag. 36**
4.2	ICTUS ISCHEMICO - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 38**
5.1	STENOSI CAROTIDEE - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 42**
5.2	STENOSI CAROTIDEE - Pubblicazione	**Pag. 46**
6.1	STEATOSI EPATICA - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 52**
6.2	STEATOSI EPATICA - Pubblicazione	**Pag. 54**
7.1	CARCINOMA PROSTATICO - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 60**
7.2	CARCINOMA PROSTATICO - Pubblicazione	**Pag. 66**
8.1	MOLECOLE ANTICANCRO - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 74**
8.2	MOLECOLE ANTICANCRO - Pubblicazione	**Pag. 79**
9.1	COVID 19 - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 86**
9.2	COVID 19 - Pubblicazione	**Pag. 90**
9.3	COVID 19 - Lettera di accettazione	**Pag. 97**
10.1	CARCINOMA EPATICO - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 100**
10.2	CARCINOMA EPATICO - Pubblicazione	**Pag. 103**
11	RIDUZIONE DEI R.O.S. - Ricerca Uniroma 2, Prof. Colizzi	**Pag. 108**
12.1	ULCERE DA PRESSIONE - Ricerca Uniroma 2	**Pag. 114**
12.2	ULCERE DA PRESSIONE - Pubblicazione	**Pag. 125**
13	CERTIFICAZIONI INTERNAZIONALI	**Pag. 126**

1

CARCINOMA POLMONARE

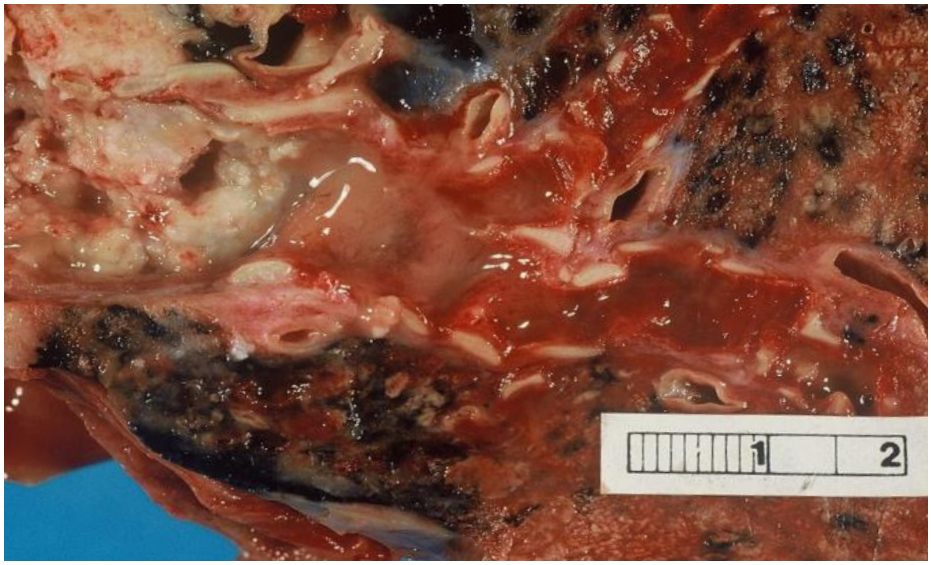
1.1 CARCINOMA POLMONARE - Ricerca Uniroma 2

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
Laboratorio di Citologia, Istologia e Oncologia Sperimentale: Prof. Simone Beninati

3ª Relazione del progetto:
Ricerca della potenziale azione del "Texidrofolico" sulla regressione del tumore polmonare e valutazione sulla qualità della vita del paziente.

Introduzione

Il *Pemetrexed* (*LY231514, Alimta; Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN*) è un nuovo antifolato che viene metabolizzato a livello intracellulare in una forma di pentaglutammato. Viene utilizzato per il trattamento di pazienti non pretrattati con mesotelioma pleurico maligno non resecabile in combinazione con cis-platino e anche per il trattamento in monoterapia del carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), localmente avanzato o metastatico dopo chemioterapia. Il *Pemetrexed* inibisce tre enzimi (timidilato sintasi, diidrofolato reduttasi e glicinamide ribonucleotide transferasi) coinvolti nel metabolismo dei folati e nella sintesi del DNA. La citotossicità del *Pemetrexed* è causata dall'inibizione di entrambe le vie pirimidinica e purinica. La dose massima tollerata, stabilita negli studi di Fase I del *Pemetrexed* era di 600 mg / m^2 ogni 3 settimane. Questa dose è stata da noi ridotta a 500 mg / m^2 ogni 3 settimane negli studi di Fase II effettuati, in particolare se usato in associazione con gli integratori oggetto di questo studio.
Il razionale della sperimentazione da noi effettuata, nasce dalla pubblicazione che ha dimostrato che l'integrazione con acido folico e vitamine del gruppo B rappresenta un requisito di base per ridurre la tossicità della terapia a base di ***Pemetrexed***.
Tale dato è stato confermato dall'analisi dei dati ottenuti dagli studi multipli sulla tossicità di questo farmaco. **In conclusione diverse osservazioni hanno suggerito che l'integrazione con "food-supplements", può ridurre la tossicità e migliorare la risposta durante la chemioterapia** *(Scagliotti et al , 2003).*
Il *Pemetrexed* monocomponente è stato da noi saggiato in questo progetto, che ha arruolato 60 pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule di fase II (NSCLC), sottoposti a chemioterapia, **senza e con supplementazione di *Texidrofolico***, in accordo con il protocollo suggerito dalla casa produttrice.



Il carcinoma a grandi cellule è meno frequente e può crescere e diffondersi rapidamente in diverse parti del polmone.

Il *Texidrofolico* (Citozeatec, Italia) è un integratore alimentare che ha mostrato in studi precedenti una spiccata attività antiproliferativa. L'incorporazione dei suoi componenti nella cellula determina variazione dell'attività mitocondriale incidendo sull'attività della catena respiratoria (Progetto: *"Effetti dei componenti del Citozym sulla crescita cellulare normale e neoplastica"* studio metabolico in progresso).

Il "NSCLC*"* comprende:

1. il *carcinoma spino cellulare o a cellule squamose,* con prognosi migliore, si forma dall'epitelio che riveste i bronchi di medio e grande dimensioni.
2. L'*adenocarcinoma* si localizza, a livello dei bronchi di calibro minore. È il tumore polmonare più frequente, tra chi non ha mai fumato e probabilmente deriva da cicatrici da infezioni tubercolari o pleuriti.
3. Il *carcinoma a grandi cellule* è meno frequente e può crescere e diffondersi rapidamente in diverse parti del polmone.

Premessa

Gli studi svolti durante la Fase II sono generalmente studi esploratori che cercano di scoprire se il farmaco tratta la malattia o il disturbo associato al trattamento terapeutico. L'obiettivo dell'attuale studio di fase II è quello di determinare l'attività antitumorale della combinazione *Pemetrexed-Texidrofolico*, in un regime ambulatoriale esente da cis-platino, in pazienti soggetti a precedente chemioterapia con NSCLC localmente avanzato o metastatico. Gli *endpoint* preliminari sono focalizzati sulla valutazione della tossicità del trattamento, della sopravvivenza generale e libera da progressione e in particolare l'impatto sui sintomi e sulla qualità della vita del paziente. La presente relazione è focalizzata sulla determinazione della qualità della vita dei pazienti esaminati secondo il protocollo citato. Questo studio è stato condotto secondo la Dichiarazione di Helsinki e il protocollo è stato approvato da ciascun comitato di revisione istituzionale locale e dal comitato di revisione etica locale.

Risultati e Metodi

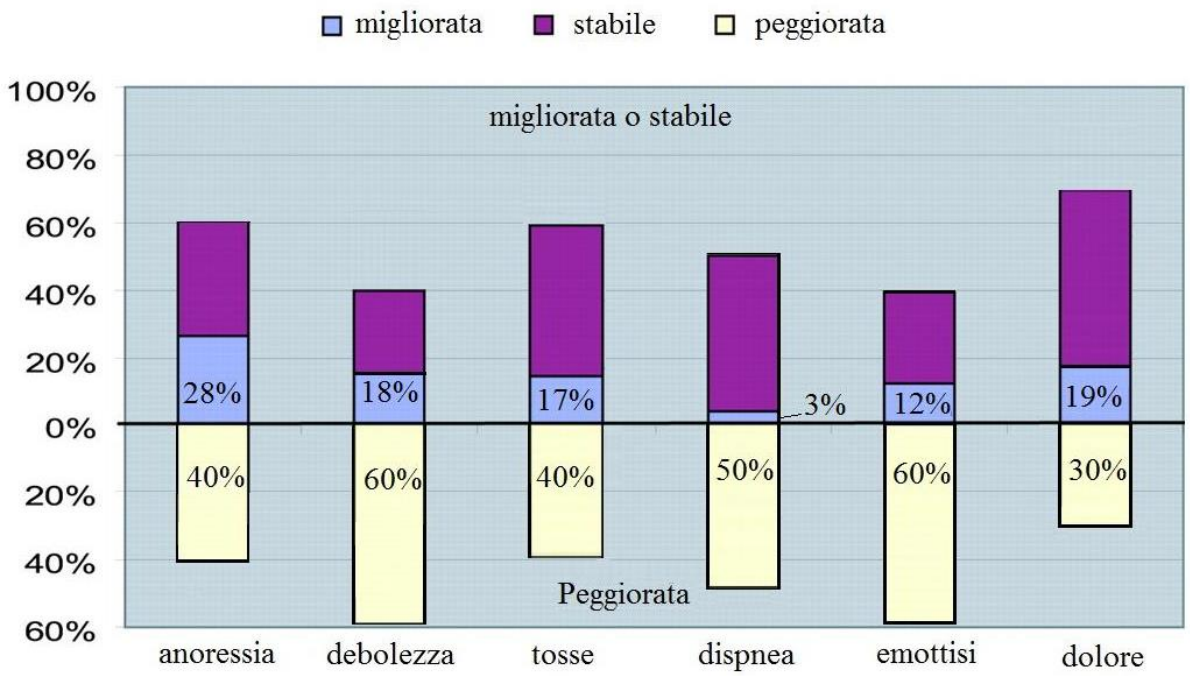
Tutti i pazienti che hanno ricevuto una dose di solo *Pemetrexed* (controllo) e una miscela di *Pemetrexed-Texidrofolico* sono stati valutati per la tossicità e per la potenziale variazione dei sintomi tipici (anoressia, debolezza, tosse, dispnea, emottisi, dolore). Una valutazione clinica e di laboratorio è stata eseguita settimanalmente e le tossicità sono state classificate in base ai criteri di tossicità comuni. Simultaneamente, entro 3 settimane prima del ciclo iniziale, le misurazioni del tumore sono state eseguite mediante tomografia computerizzata o risonanza magnetica. Lo stesso metodo di misurazione è stato eseguito prima di ogni altro ciclo di terapia. La conferma della risposta è stata eseguita 2-3 settimane dopo la prima evidenza di risposta. I pazienti erano valutabili per la risposta se avevano un esame di riferimento e almeno un esame di follow-up e avevano ricevuto almeno un ciclo di trattamento. I risultati di questa indagine, sulla potenziale attività antitumorale, saranno oggetto di una successiva relazione.

Prima di ogni ciclo, i sintomi e i dati sulla qualità della vita sono stati raccolti con la scala del cancro del polmone (LCSS), come riportato da *Hollen et al. (1994)*. I cambiamenti clinicamente significativi sono stati definiti come variazioni rispetto al basale, che sono state mantenute per almeno due cicli (***Figura 1*** *e* ***2***). In questo caso i pazienti sono stati considerati sintomatici cioè responsivi. I sintomi sono stati classificati come migliorati, peggiorati o stabili, in base al modello di cambiamento; i sintomi per i pazienti senza una valutazione di conferma sono stati classificati come sconosciuti.

Attività antitumorale

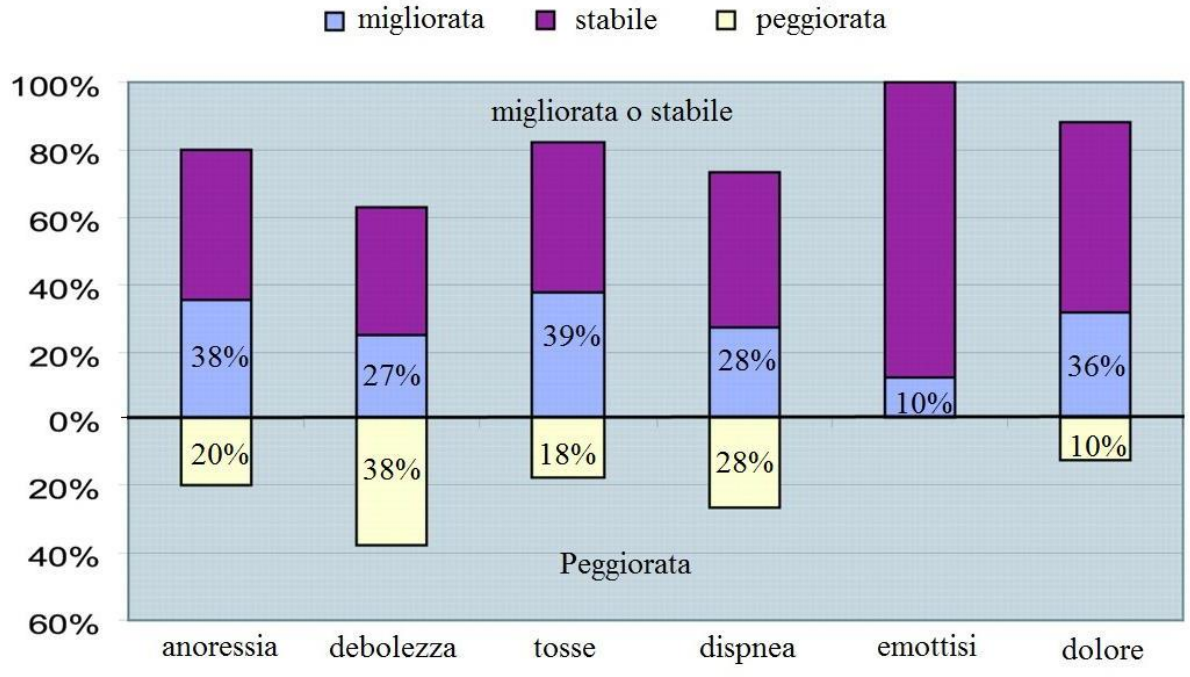
L'attività antitumorale del solo *Pemetrexed* o in combinazione con il protocollo con alla base il *Texidrofolico* è in corso di studio. I pazienti attualmente sono sottoposti ad esami clinici che compendiano anche la risonanza magnetica ed eventualmente la tomografia computerizzata. Dai dati presentati negli istogrammi di ***Figura 1*** *e* ***2***, si può presumere che i miglioramenti della qualità della vita possano incidere anche sullo sviluppo del tumore. Al fine di poter dimostrare tale evenienza i pazienti trattati con la terapia combinata *Pemetrexed-Texidrofolico,* secondo il protocollo sperimentale utilizzato, saranno osservati per almeno 60 giorni e i dati ottenuti confrontati con i controlli.

Figura 1. Pemetrexed



*Dati sulla qualità della vita di pazienti portatori di NSCLC a diversi stadi trattati esclusivamente con la **terapia Pemetrexed** per 60 giorni. Evidenti gli elementi che rendono peggiore la qualità della vita, in particolare l'emottisi (60% dei pazienti), la debolezza (60% dei pazienti) e la dispnea (50% dei pazienti).*

Figura 2. Pemetrexed - Texidrofolico (Citozeatec)



*Dati sulla qualità della vita di pazienti portatori di NSCLC a diversi stadi trattati con la **terapia combinata Pemetrexed-Texidrofolico** per 60 giorni. Si notano miglioramenti della qualità della vita (colonne blu), in particolare l'emottisi divenuta stabile (90% dei pazienti-colonne rosse), la debolezza, il dolore e la dispnea ridotte del 20%. I miglioramenti sono evidenti rispetto alla sola chemioterapia (riduzione delle colonne gialle).*

Tabella I

PERCENTUALE DI PAZIENTI CON QUALITA' DELLA VITA MIGLIORATA					A	
TRATTAMENTO	1	2	3	4	5	6
Pemetrexed	28%	18%	17%	3%	12%	19%
Pemetrexed -Texidrofolico	38%	27%	39%	28%	10%	36%
IMPROVEMENTS	10%	9%	22%	25%	-2%	17%
PERCENTUALE DI PAZIENTI CON QUALITA' DELLA VITA STABILE					B	
TRATTAMENTO	1	2	3	4	5	6
Pemetrexed	32%	22%	43%	47%	28%	51%
Pemetrexed -Texidrofolico	42%	35%	43%	44%	90%	54%
IMPROVEMENTS	10%	13%	0%	-3%	62%	-3%
PERCENTUALE DI PAZIENTI CON QUALITA' DELLA VITA PEGGIORATA					C	
TRATTAMENTO	1	2	3	4	5	6
Pemetrexed	40%	60%	40%	50%	60%	30%
Pemetrexed -Texidrofolico	20%	38%	18%	28%	0%	10%
IMPROVEMENTS	20%	22%	22%	22%	60%	20%

Valutazione della qualità della vita secondo la scala del cancro del polmone (LCSS), proposta da Hollen et al. (1994). 60 pazienti divisi in due gruppi di 30 soggetti ognuno, trattati per 60 giorni con ***solo Pemetrexed*** *o con questo* ***in combinazione con Texidrofolico*** *in accordo con il protocollo fornito dalla casa produttrice Citozeatec.* ***1. Anoressia; 2. Debolezza; 3. Tosse; 4. Dispnea; 5. Emottisi; 6. Dolore.***

Discussione

Poiché la maggior parte degli agenti antitumorali ha una stretta finestra terapeutica, l'ottimizzazione della possibilità che un trattamento abbia esito positivo senza causare indebiti danni al paziente è di fondamentale importanza. Le informazioni accurate sul nuovo farmaco e sul paziente diventano critiche. Interruzione dello sviluppo di un nuovo farmaco o limitazione della sua efficacia o ampio uso si verifica quando si nota o tossicità grave o mancanza di efficacia. Non è insolito che, quando un nuovo agente mostra tossicità con un'attività antitumorale limitata, si faccia poco sforzo per cercare costantemente modi per aggirare la tossicità con la possibilità di migliorare l'efficacia. La tossicità o la mancanza di efficacia potrebbero essere correlate al profilo clinico, demografico o genetico individuale di un paziente. Idealmente, l'obiettivo è ideare una strategia di dosaggio semplice e ottimale per un nuovo agente che incorpori ciò che è noto sul suo meccanismo d'azione e sulle caratteristiche del paziente. Questo paradigma è l'oggetto del presente studio.

Discutiamo di come, dopo l'insorgenza di gravi problemi di sicurezza, siano stati identificati fattori predittivi di grave tossicità associati a *Pemetrexed* e come questi fattori abbiano portato alla formulazione di un intervento clinico per modulare la tossicità di questo agente antifolato / antitumorale migliorandone l'efficacia. I risultati di questo intervento clinico prospettico saranno oggetto di una sperimentazione successiva.

Gli antifolati rappresentano una delle classi più studiate di agenti antineoplastici, con aminopterina che inizialmente dimostrava attività clinica più di 70 anni fa *(Farber et al. 1948)*. La conseguente inibizione del metabolismo dei folati intracellulari porta all'inibizione della crescita cellulare. Il metotrexato è stato sviluppato poco dopo e, oggi, è un componente standard di regimi chemioterapici efficaci per tumori maligni come linfoma, carcinoma mammario e tumore della testa e del collo. L'attività citotossica e la successiva efficacia degli antifolati possono essere associate a una sostanziale tossicità per alcuni pazienti. Gli antifolati, come classe, sono stati associati a una mielosoppressione grave sporadica con tossicità gastrointestinale. Sebbene non frequente, una combinazione di tali tossicità può comportare un alto rischio di mortalità. L'incapacità di controllare queste tossicità ha portato alla sospensione dello sviluppo clinico di alcuni antifolati, come CB3717, e ha complicato lo sviluppo clinico di altri, come il lometrexol e il raltitrexed. La capacità di predire quei pazienti che sono a maggior rischio di sviluppare gravi tossicità e la riduzione della stessa, rappresenterebbe un importante vantaggio nell'uso di questi agenti antitumorali.

Diverse pubblicazioni scientifiche riportano che il trattamento clinico di pazienti portatori di NSCLC con *Pemetrexed* integrato con acido folico e vitamina del gruppo B riduce notevolmente le tossicità associate alla chemioterapia *(Scagliotti et. al., 2003)*. I componenti del *Texidrofolico* compendiano l'acido folico e la vitamina B5 e B9, quindi l'uso di questo integratore alimentare come supplemento nel trattamento chemioterapico del NSCLC, potrebbe ridurre la tossicità del trattamento migliorando la qualità della vita dei pazienti. I dati sperimentali che presentiamo hanno appunto dimostrato questa ipotesi di lavoro. In particolare alcuni sintomi classici della chemioterapia sono stati ridotti drasticamente, come si evince dalla ***Tabella I***. Il dato positivo è rappresentato dal miglioramento di circa il 20% dei sintomi Dispnea e Tosse nei pazienti trattati con terapia combinata (***Tabella I, A***).

E' noto che l'emottìsi è l'emissione di sangue dalle vie respiratorie, solitamente attraverso un colpo di tosse.

Il dato interessante ottenuto con la terapia combinata *Pemetrexed-Texidrofolico* per 60 giorni, ha stabilizzato l'emottìsi nel 62% dei pazienti osservati (*Tabella I B*), migliorando del 60% la qualità della vita (*Tabella I C*).

In conclusione, abbiamo osservato una riduzione di circa il 20% dei pazienti con qualità della vita peggiorata per tutti i sintomi esaminati, con un picco del 60% per l'emottìsi (*Tabella I C*).

La sperimentazione continua per evidenziare le potenziali capacità antitumorali della terapia combinata da noi adottata.

Bibliografia

***Scagliotti GV**, Shin DM, Kindler HL, et al. Phase II study of pemetrexed with and without folic acid and vitamin B_{12} as front-line therapy in malignant pleural mesothelioma. J Clin Oncol 2003; **21**:1556–61.*

***Hollen PJ**, Gralla RJ, Kris MG, et al Measurement of quality of life in patients with lung cancer in multicenter trials of new therapies. Psychometric assessment of the Lung Cancer Symptom Scale. Cancer (Phila), **73**:2087-98, 1994.*

***Farber S**, Diamond LK, Mercer RD, et al. Temporary remissions in acute leukaemia in children produced by folic acid antagonist 4- amino pteroyl-glutamic acid (aminopterin). N Engl J Med 1948; **238**:787–93*

Roma, 07/11/2018

Prof. Simone Beninati

Direttore Laboratorio di Oncologia Sperimentale
Dott. Francesco Antonelli

PubMed.gov

L'integratore alimentare orale previene la perdita di peso e riduce gli effetti collaterali nei pazienti in chemioterapia avanzata per il cancro del polmone

Piera Torricelli [1], Francesco Antonelli [2], Pasquale Ferorelli [2], Ilaria Borromeo [2], Anna Shevchenko [3], Stefano Lenzi [4], Angelo De Martino [5]

PMID: 32034492 - DOI: 10.1007/s00726-020-02822-7

Abstract

La perdita di peso nei pazienti con cancro è causata dalla cachessia da cancro e dalla nausea e dal vomito indotti dalla chemioterapia. I recenti sviluppi nei farmaci antiemetici hanno sostanzialmente migliorato la nausea e il vomito, ma questo intervento non ha ridotto la perdita di peso e altri effetti collaterali più gravi della chemioterapia, come anoressia, debolezza, tosse, dispnea, emottisi e dolore. Questo studio mirava a studiare gli effetti dell'intervento nutrizionale con un integratore alimentare, durante la chemioterapia in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) avanzato non squamoso. I pazienti hanno ricevuto una consulenza nutrizionale personalizzata da un dietista registrato e sono stati forniti integratori orali di Texidrofolico® per 90 giorni. Il peso corporeo e gli altri effetti collaterali menzionati sono stati valutati al basale e dopo 90 giorni di intervento. Per valutare gli effetti di questo integratore alimentare, un totale di 30 pazienti sono stati arruolati retrospettivamente come controlli e il peso corporeo e la variazione degli effetti collaterali della chemioterapia sono stati confrontati con quelli osservati in 30 pazienti trattati con Texidrofolico®. Dopo 90 giorni di intervento, con integrazione orale di Texidrofolico®, i pazienti, nel corso della chemioterapia citotossica, hanno mostrato un miglioramento della qualità della vita e una perdita di peso e BMI non significativa rispetto al gruppo di controllo. Inoltre, il numero di pazienti, trattati con Texidrofolico® che hanno mantenuto o aumentato il loro peso corporeo, dopo 90 giorni di trattamento era significativamente più alto rispetto al gruppo di controllo. Gli effetti del trattamento con l'integratore alimentare sono stati studiati anche da un punto di vista metabolico. È stato possibile scoprire che uno dei marcatori noti della crescita del tumore, le poliammine plasmatiche, era ridotto dopo il trattamento. Viene discussa una possibile relazione tra queste ammine biogene e il ciclo dei folati. In conclusione, un intervento precoce di nutrizione intensiva con integratori orali di Texidrofolico® durante la chemioterapia dei pazienti con NSCLC previene la perdita di peso ed è benefico per la loro qualità di vita.

Parole chiave: chemioterapia; NSCLC; Supplemento nutrizionale; poliammine; Qualità della vita.

2

SCLEROSI MULTIPLA

2.1 SCLEROSI MULTIPLA - Ricerca Uniroma 2

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

Prof. Simone Beninati

*Relazione intermedia "**Progetto Sclerosi Multipla**"*

Introduzione

Durante questo studio osservazionale abbiamo potuto notare che fra i molteplici sintomi dei volontari affetti da Sclerosi Multipla [SM], la stanchezza è una delle lamentele più dolorose che i pazienti con SM possono sperimentare nel corso della loro vita. Nonostante la sua alta prevalenza, la fisiopatologia della fatica da SM è ben lungi dall'essere completamente chiarita e una costellazione di meccanismi sembra implicata in questo contesto. Diversi fattori potrebbero contribuire al suo sviluppo e / o esacerbazione, e questo richiede un attento work-up al fine di cercare tutte le possibili cause di fondo, come disturbi del sonno, disfunzioni endocrine e disturbi dell'umore, per citarne alcuni. Abbiamo centrato la sperimentazione, tesa a dimostrare eventuali effetti benefici della somministrazione di alcuni integratori nutrizionali, sul sintomo "fatica", valutabile tramite il "*Fatigue Severity Scale*" (FSS) (*Krupp et al., 1989*). Il FSS è una scala di auto- relazione di nove voci sulla fatica, sulla sua gravità e su come influisce su alcune attività. Le risposte sono segnate su una scala di sette punti dove 1 = nessuna fatica e 7 = molta fatica. Più alto è il punteggio, più la fatica è grave e più influisce sulle attività della persona.

Krupp LB, La Rocca NG, Muir-Nash J, Steinberg AD. ***The fatigue severity scale. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus****. Archives of Neurology. 1989;46:1121–1123.*

Nonostante l'alta prevalenza e la natura debilitante del sintomo "Fatica", i suoi meccanismi di fondo sono ancora ben lungi dall'essere pienamente compresi. A questo proposito, gli studi hanno evidenziato il ruolo di vari fattori strutturali, funzionali e immunologici (*Flachenecker et al., 2003*). Inoltre, esistono diversi limiti nella misurazione della fatica, poiché la sua valutazione si basa principalmente su una serie di strumenti soggettivi che sono stati scelti come risultati primari nella maggior parte degli studi. La situazione è ulteriormente complicata dalla mancanza di protocolli di gestione efficienti e soddisfacenti.

P. Flachenecker, A. Rufer, I. Bihler, C. Hippel, K. Reiners, K.V. Toyka, et al. ***Fatigue in MS is related to sympathetic vasomotor dysfunction Neurology****, 61 (2003), pp. 851-853*

Ruolo dello stress ossidativo nella sclerosi multipla

Recentemente, è stato riportato che lo stress ossidativo può svolgere un ruolo nella demielinizzazione e nel danno assonale in pazienti con SM, entrambi i quali possono portare a danni cellulari attraverso l'azione di componenti cellulari ossidanti, compresi i lipidi, le proteine e il DNA.
La distruzione mielinica gioca il ruolo primario nella disabilità nei pazienti con SM, e le guaine mieliniche sono altamente sensibili alla stress ossidativo.

Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D (2004) ***The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy****. J Neurol 251:261–268*

Esiste un equilibrio tra il danno ossidativo e la protezione antiossidante nelle normali cellule aerobiche. Una protezione antiossidante insufficiente o un'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) genera una condizione nota come stress ossidativo, che si ritiene abbia un ruolo importante nella SM.

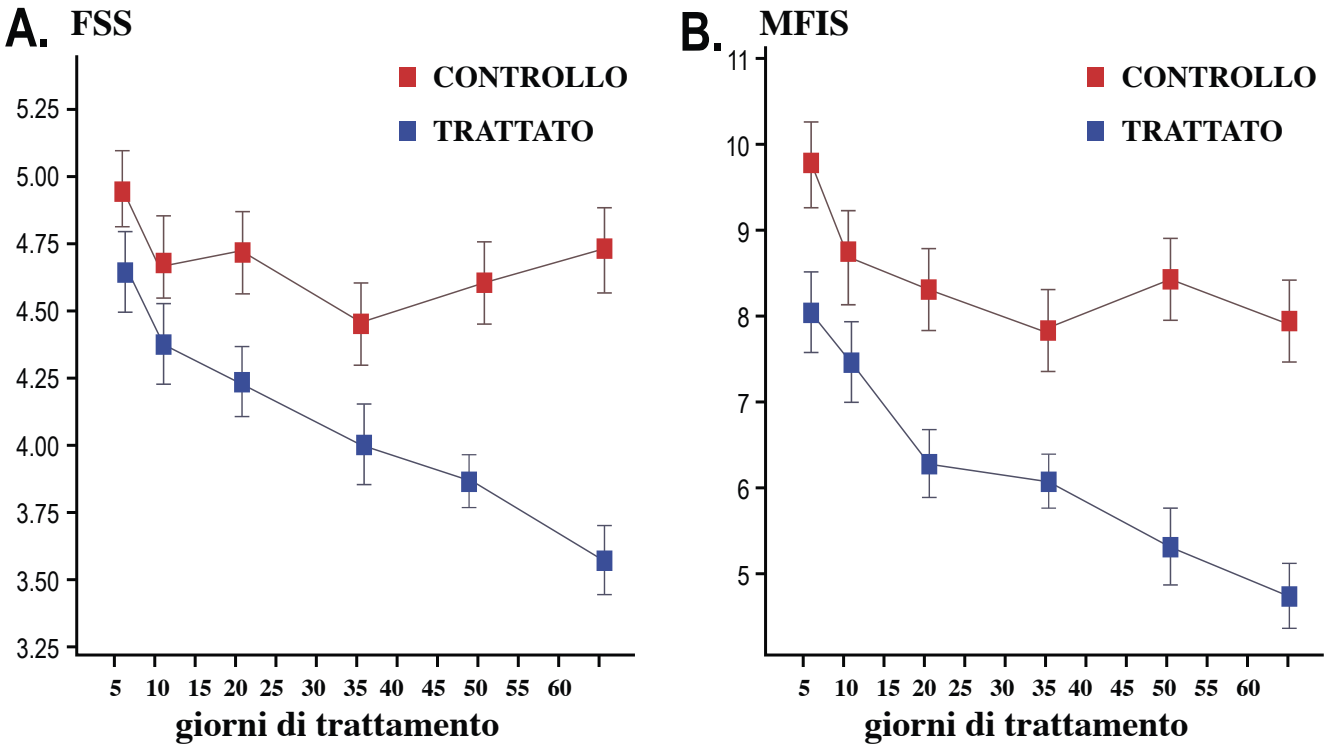
Protocollo sperimentale
Come accennato nelle relazioni precedenti, uno degli aspetti da valutare e la identificazione di anomalie comportamentali (vedi relazioni precedenti). Queste comprendono: disturbi visivi, disturbi di sensibilità, fatica, e debolezza muscolare.

- **disturbi visivi**: possono includere calo della vista rapido e rilevante, di solito in un occhio, sdoppiamento della vista, movimenti non controllabili dell'occhio. Spesso questi disturbi sono accompagnati da dolore all'occhio;
- **disturbi delle sensibilità**: sensazione di intorpidimento, formicolii, perdita di sensibilità al tatto, difficoltà a percepire il caldo e il freddo. Questi disturbi possono essere presenti nelle braccia, gambe, tronco o anche al volto;
- **fatica**: mancanza di energia fisica e mentale, diversa dalla stanchezza perché si presenta anche in assenza di sforzi o attività fisica e non migliora con il riposo;
- **debolezza**: diminuzione della forza muscolare. Possono manifestarsi singolarmente oppure insieme. Anche l'intensità e la durata possono essere molto diversi. Alcuni sintomi sono comuni ad altre malattie o condizioni, per questo può accadere che il percorso per arrivare alla conferma della diagnosi sia, a volte, lungo e complesso.

Abbiamo concentrato la nostra attenzione sul sintomo fatica. La stanchezza è stata definita come una "mancanza soggettiva di energia fisica e/o mentale che viene percepita dall'individuo come un'interferenza con le attività abituali e desiderate". (*Multiple Sclerosis Council for Clinical Practice Guidelines, MSCCPG 1998*) ed è tra i sintomi più comuni e disabilitanti riportati dai pazienti con SM.
Le stime della prevalenza della fatica nelle persone con SM vanno dal 53 al 92%. Una revisione della letteratura di studi indicizzati che misurano la fatica nella SM tra il 2005 e il 2010 ha identificato 32 diverse misure di auto-rapporto della fatica. Tra queste, i test più comunemente usati sono stati la "*Fatigue Severity Scale*" (FSS) e la "*Modified Fatigue Impact Scale*" (MFIS) (MSCCPG, 1998).
Come per lo FSS anche nello MFIS un punteggio più alto significa che la fatica influisce in modo più significativo sulla vita del paziente.
Lo scopo di questo studio è stato centrato nel confronto del funzionamento psicometrico del FSS e del MFIS nel nostro campione di persone con SM. In particolare, abbiamo valutato le variazioni di questi due parametri durante il trattamento cronico con due integratori alimentari.
Oltre alle tradizionali analisi psicometriche, abbiamo usato un approccio basato sulla teoria della risposta agli item per valutare la precisione del MFIS e dell'FSS a diversi livelli di fatica (ad esempio, alta o bassa fatica).
L'attività di ossidazione enzimatica (***Tabella I***) è stata valutata nel nostro laboratorio da campioni ematici prelevati dai pazienti trattati e non trattati. E' stato valutato lo stato antiossidante totale (**TAS**) e l'attività della catalasi (**CAT**). La Glutatione-perossidasi (**GPx**) e la superossido dismutasi (**SOD**) sono state determinate utilizzando la tecnica di Oberley e Spitz (*1984*).

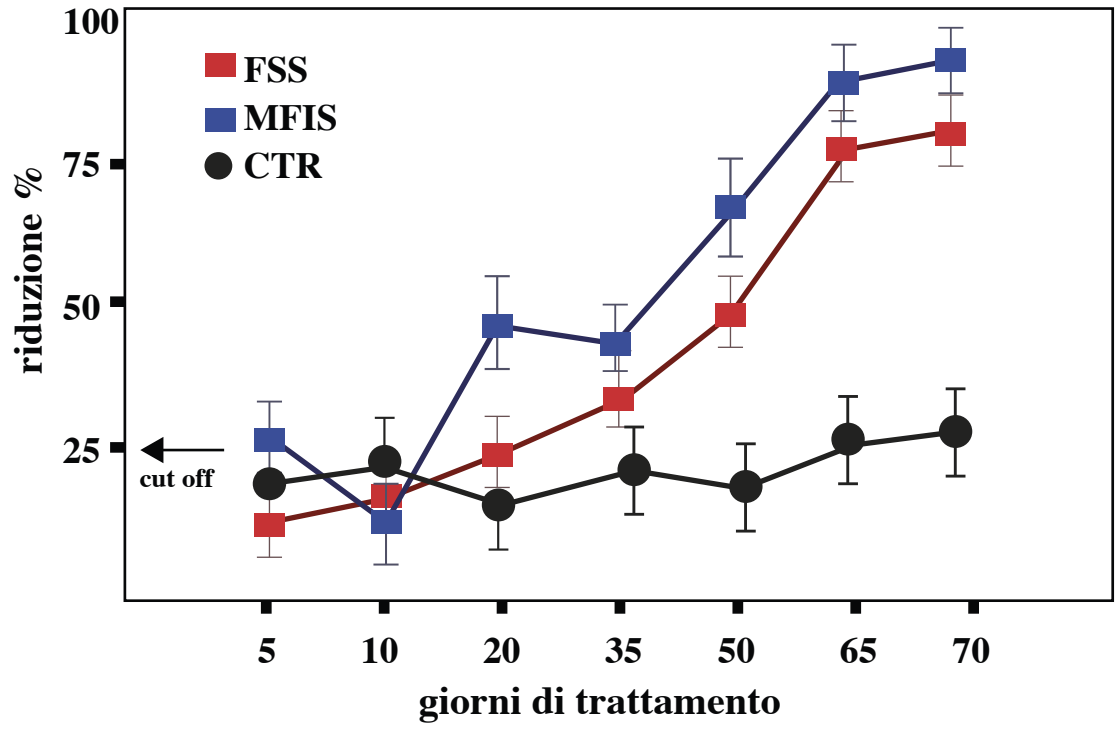
Risultati
I controlli effettuati hanno evidenziato che il trattamento ha ridotto drasticamente i valori del FSS (***Figura 1 A***) dalla media nei controlli di circa 5.00-4.75 a valori che dopo 20 giorni di trattamento hanno raggiunto 4.2, 3.8 dopo 50 giorni e 3.6 dopo 70 giorni. Il significato di queste riduzioni, indica un netto miglioramento del sintomo fatica.
Tale situazione è stata confermata dal test MFIM che si è ridotto significativamente durante il periodo di 70 giorni di trattamento (***Figura 1 B***). Le riduzioni percentuali, indicate nella ***Figura 2***, confermano la netta riduzione dei due valori dei test (FSS e MFIS) comparati con i valori di controllo.
I test effettuati al fine di controllare lo stato ossidativo dei pazienti, hanno evidenziato un potenziamento dei valori dello stato antiossidante totale (TAS). Il TAS che rispetto al controllo dopo 70 giorni (0.74 U/mg proteina) è risultato nei trattati di 1.82 U/mg di proteina.
Il dato dimostra l'efficacia del trattamento nel potenziare lo stato antiossidante del paziente. Stessi risultati ottenuti sia per il GPx (0.82 di base e 2.95 dopo trattamento), Cat (98.72 di base e 105.64) e la SOD (2.68 di base e 5.86) valori espressi come U/m di proteina.

Figura 1



Valori del FSS e del MFIS riscontrati in individui affetti da SM. Ogni valore rappresenta la media di 30 pazienti ± DS, trattati con per più di 60 giorni e non trattati come controllo (CRT).

Figura 2



Variazioni percentuali della riduzione dei sintomi della fatica in pazienti affetti da SM durante 70 giorni di trattamento. La sintomatologia è stata giudicata ridotta considerando un cut off del 25% tipico dei pazienti non trattati. I valori rappresentano la media di quattro osservazioni ±SD.

Tabella 1. *Valori dello stato antiossidante totale (TAS), la Glutatione-perossidasi (GPx), l'attività della catalasi (CAT) e della superossido dismutasi (SOD), in pazienti affetti da SM trattati e di controllo a tre tempi di trattamento (tempo 10, 35 e 70 giorni). I valori rappresentano la media di 30 pazienti trattati e 30 pazienti di controllo ± DS.*

	TAS (U/mg protein)		
controllo	**1.24 (0.17)**	**0.90 (0.16)‡**	**0.74 (0.20)**
trattati	**1.64 (0.28)**	**1.70 (0.21)‡**	**1.82 (0.12)**
	GPx (U/mg protein)		
controllo	**2.53 (1.55)‡**	**0.76 (0.33)**	**0.82 (0.20)‡**
trattati	**2.86 (0.48)‡**	**2.87 (0.62)**	**2.95 (0.67)‡**
	Cat (U/mg protein)		
controllo	**69.83 (26.24)**	**104.92 (49.17)**	**98.72 (56.17)**
trattati	**97.14 (45.38)**	**98.42 (20.59)**	**105.64 (51.76)**
	SOD (U/mg protein)		
controllo	**3.38 (1.1)**	**3.65 (1.12)**	**2.68 (0.49)**
trattati	**6.86 (1.62)**	**5.47 (2.14)**	**5.86 (1.55)**

Statistica

I dati sono stati analizzati con l'ausilio di un software di statistica computerizzata (*Stata Corporation, College Station, Texas, USA*). I punteggi FSS di base e MFIS sono stati adattati al fine di ottenere una distribuzione normale. Sono state apportate modifiche in base alle variabili binarie per età, sesso, stato di disabilità estesa (EDSS) e decorso della malattia (recidivante-remittente o progressiva). Ogni volontario è stato valutato in modo indipendente per la sua associazione con un punteggio FSS di base. Sono stati definiti i gruppi di età e EDSS per età media e EDSS.
Il miglioramento è stato predefinito come un aumento maggiore di 25 ±SD (***Figura 2***) . Il peggioramento è stato definito come una diminuzione maggiore di 25 ±SD.

Discussione

La SM è una malattia neurodegenerativa che colpisce il sistema nervoso centrale. È complessa e imprevedibile, ma non è contagiosa né mortale. Grazie ai trattamenti e ai progressi della ricerca, i pazienti con SM, possono mantenere una buona qualità di vita con un'aspettativa non distante da chi non riceve questa diagnosi. È caratterizzata da una reazione anomala delle difese immunitarie che attaccano alcuni componenti del sistema nervoso centrale scambiandoli per agenti estranei, per questo rientra tra le patologie autoimmuni. È una malattia cronica e al momento infatti non esiste una cura definitiva, ma sono disponibili numerose terapie che modificano il suo andamento, rallentandone la progressione. Quindi la strategia attuale è quella di ridurre i sintomi della malattia ed in particolare quelli più debilitanti per il paziente.
La fatica è uno dei sintomi più comuni della sclerosi multipla, può comparire già nelle prime fasi della malattia, ed influenza la vita di una vasta maggioranza di pazienti con SM. Si calcola che ne siano colpite una percentuale variabile dal 75% al 95%, molti dei quali giudicano questo sintomo tra i peggiori della malattia. In ogni persona con SM la fatica si manifesta in modo soggettivo.
Per valutare l'entità del sintomo, oltre ai comuni esami (clinici e strumentali) e alla storia clinica della persona con SM, esistono scale e questionari che permettono valutazioni di tipo soggettivo, che si basano su percezioni individuali, e valutazioni di tipo oggettivo, che quantificano il sintomo in relazione alla riduzione della forza muscolare, al consumo di energia e ai tempi necessari a svolgere determinate attività.

Una corretta gestione della fatica è fondamentale per ridurre il suo impatto nella vita di tutti i giorni, per imparare a svolgere le attività quotidiane in modo più efficiente e per risparmiare la maggior energia possibile.
Abbiamo centrato il nostro studio sul sintomo fatica, identificando elementi che possono far ipotizzare che il sintomo fatica da SM possa essere migliorato con il trattamento combinato di integratori tesi a stimolare il biochimismo enzimatico del paziente.
I due integratori utilizzati (**Citozym** e **Ergozym Plus**) somministrati secondo un protocollo sperimentale elaborato sulla base di studi precedenti, hanno mostrato una netta riduzione dei parametri FSS e MFIS, per la valutazione del parametro fatica.
Inoltre, l'analisi della regressione logistica ha mostrato che i fattori che variano tra i due gruppi di trattamento non ha avuto alcun effetto sulla possibilità di migliorare la fatica o sulla relazione tra il gruppo di trattamento e il miglioramento della fatica. L'interpretazione dei dati dalle scale basate sul paziente (FSS e MFIS) è ancora una questione controversa. Mentre il FSS può rilevare le differenze tra pazienti affaticati e non affaticati e può rilevare un effetto terapeutico, non è ancora chiarito quanto il cambiamento sia clinicamente significativo. Abbiamo scelto il 25% come *cut off* (***Figura 2***) perché questo è un limite comunemente usato in psicometria e perché valori più alti rileverebbero probabilmente solo estremi casi, mentre un taglio più basso probabilmente sovrastimerebbe la proporzione di pazienti realmente migliorati. Ulteriori ricerche sono in corso per determinare i valori di FSS necessari per poter considerare il miglioramento come un cambiamento clinicamente significativo. E' importante considerare anche che il miglioramento del sintomo fatica può avere un effetto sugli aspetti psicosociali del paziente e sulle capacità operative giornaliere.
L'affaticamento ridotto probabilmente migliorerebbe le funzioni fisiche e cognitive prima di portare alla risposta comportamentale richiesta per migliorare gli aspetti psicosociali della fatica. Questo è quanto sarà esaminato nella fase successiva di questo studio.
Secondo alcune recenti pubblicazioni, lo stato ossidativo può avere un ruolo nell'infiammazione cronica e nella neuro degenerazione che sono considerati fattori eziopatogenetici critici nella SM, sia nella fase iniziale della malattia che in quella progressiva. Lo scopo di questo studio è stato anche quello di indagare lo stato ossidativo, correlato al sintomo fatica, nel sangue periferico dei volontari affetti da SM con ridotta disabilità. Il trattamento con gli integratori citati ha permesso di evidenziare una netto incremento dei parametri biochimici correlati all'incremento dello stato antiossidante totale (TAS) ed a molti enzimi correlati con lo stato ossidativo del paziente.
La ricerca è attualmente centrata sull'elaborazione dei dati statistici tesi a dimostrare che il trattamento con Citozym e Ergozym Plus, può rappresentare una soluzione per alleviare il sintomo fatica nei pazienti con SM, senza avere la pretesa di curare o ridurre la sintomatologia della malattia.

Roma, 11/08/2020

Prof. Simone Beninati
Professore Onorario DTV



2.2 SCLEROSI MULTIPLA - Pubblicazione

PubMed.gov

Riduzione dei sintomi di affaticamento a seguito della somministrazione di integratori alimentari in pazienti con sclerosi multipla

Pasquale Ferorelli [1], Francesco Antonelli [2], Anna Shevchenko [3], Carlo Mischiati [4], Manfred Doepp [5], Stefano Lenzi [6], Ilaria Borromeo [7], Giordana Feriotto [8], Simone Beninati [9]

PMID: 34287336 - PMCID: PMC8293375 - DOI: 10.3390/medsci9030052

Abstract

Nonostante i recenti progressi nei farmaci immunomodulatori, le terapie farmacologiche si sono dimostrate inefficaci nelle forme gravi di sclerosi multipla (SM), inclusa la sclerosi multipla secondariamente progressiva. Attualmente, le prestazioni degli interventi terapeutici sono principalmente focalizzate sul miglioramento dei sintomi per migliorare la qualità della vita del paziente (QOL). Tra i trattamenti complementari, l'alimentazione è stata considerata un fattore decisivo per controllare i sintomi e migliorare il benessere dei pazienti con SM. Sebbene nessuna dieta speciale sia associata alla SM, negli ultimi anni è stato studiato l'impatto della dieta e degli integratori alimentari sul decorso delle forme progressive della malattia. La fatica è tra i sintomi più comuni e invalidanti riportati dai pazienti con SM. La fatica è stata definita nelle linee guida del Consiglio per la pratica clinica sulla sclerosi multipla (MSCCPG, 1998) come una "mancanza soggettiva di energia fisica e/o mentale che l'individuo percepisce come un'interferenza con le attività abituali e desiderate". Questo studio mirava a confrontare il funzionamento psicometrico della "Fatigue Severity Scale" (FSS) e della "Modified Fatigue Impact Scale" (MFIS) nel nostro campione di persone con SM. Nello specifico, durante il trattamento cronico, la variazione di questi due parametri con due integratori alimentari ricchi di vitamine (Citozym (FSS) e la "Modified Fatigue Impact Scale" (MFIS) nel nostro campione di persone con SM. Nello specifico, durante il trattamento cronico, la variazione di questi due parametri con due integratori alimentari ricchi di vitamine (Citozym (FSS) e la "Modified Fatigue Impact Scale" (MFIS) nel nostro campione di persone con SM. Nello specifico, durante il trattamento cronico, la variazione di questi due parametri con due integratori alimentari ricchi di vitamine (Citozym® ed Ergozym ®). L'impatto di questi supplementi nutrizionali ha rivelato differenze nei parametri antiossidanti e antinfiammatori tra i volontari del gruppo di trattamento, con un conseguente miglioramento della fatica. In conclusione, i risultati ottenuti hanno confermato l'efficacia delle terapie nutrizionali complementari, valutate essenzialmente sulla base di biomarcatori ematologici, attraverso i quali è possibile agire sulla disabilità per migliorare la qualità della vita dei pazienti con SM.

Parole chiave: QOL; supplementi dietetici; fatica; sclerosi multipla; vitamine.

Dichiarazione di conflitto di interessi

Gli autori dichiarano di avere i seguenti conflitti di interesse da divulgare in relazione a questo articolo: PF, MD e SL sono stati consulenti scientifici di "CRSC". SB, IB, CM, GF e AS non hanno conflitti di interesse da divulgare in relazione a questo articolo. FA è il presidente dell'Associazione Scientifica "ARSS" che ha offerto il suo contributo come nutrizionista. Tuttavia, nessun conflitto di interesse significativo potrebbe aver influenzato i risultati di questo lavoro.

2.3 SCLEROSI MULTIPLA - Biochimica

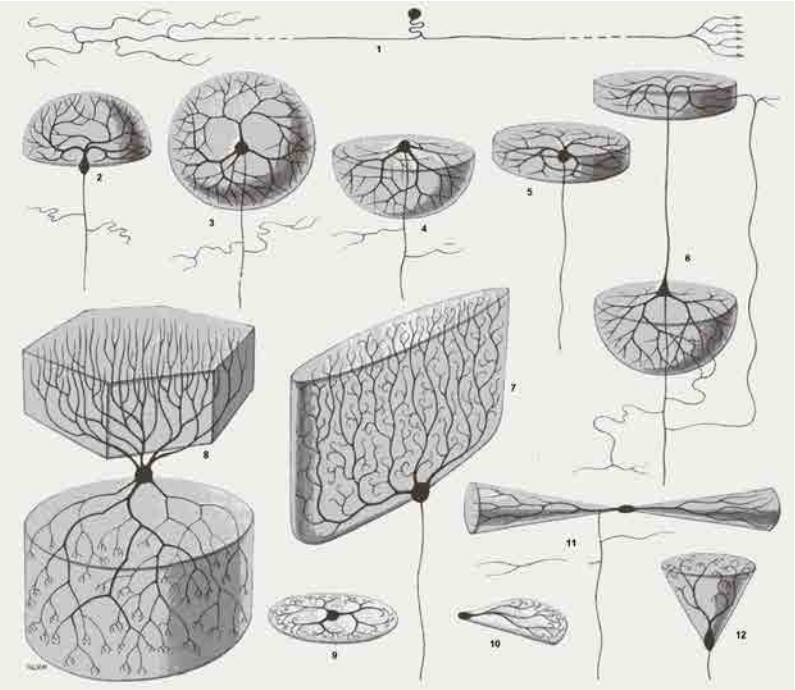
ENZIMOPATIA, LA CAUSA DI OGNI MALATTIA

“Rimielinizzazione assonale nella Sclerosi Multipla”
Ricerca svolta con le Università partecipanti.

Citologia del sistema nervoso
Nel sistema nervoso si trovano due principali componenti: le cellule eccitabili o **neuroni** e le cellule non eccitabili, che nel sistema nervoso centrale costituiscono la **nevroglia** e **l’ependima**, e, nel sistema nervoso periferico, sono rappresentate dalle cellule di **Schwann e le cellule analoghe**.

Il neurone
In confronto della maggior parte delle altre cellule i neuroni hanno una superficie molto estesa, specializzata, per la sua composizione molecolare, nella ricezione, conduzione e trasmissioni di informazioni.
Il nucleo di ciascun neurone è circondato da una massa di citoplasma contenete vari granuli; nucleo e pericario insieme formano **il pericario o perinofero;** i sottili prolungamenti che si staccano dal corpo possono essere distinti in **dendriti o assoni.**
In generale la cellula nervosa è provvista di molti dendriti, che conducono gli impulsi verso il corpo, ma di un solo assone, che li conduce dal corpo al suo terminale; il citoplasma del corpo contiene, tranne che nel cono di emergenza o collicolo assonico, sporgenza conica che si continua con l’assone, un numero di granuli o corpi di Nissel basofili.
Da altre sporgenze del corpo si originano i **dendriti primari** o principali, che si ramificano ripetutamente formando una **arborizzazione dendritica;** generalmente gli assoni terminano con numerosi, sottili terminali assonici o **telodendri,** a contatto con altri neuroni in corrispondenza delle sinapsi interneuroniche, oppure con effettori periferici, quali elementi muscolari nelle giunzioni neuromuscolari o con cellule secernenti. In alcuni casi, i terminali assonici di neuroni che sintetizzano ormoni, si trovano, in corrispondenza della parete dei vasi sanguiferi, e possono liberare il secreto direttamente nel lume vasale.

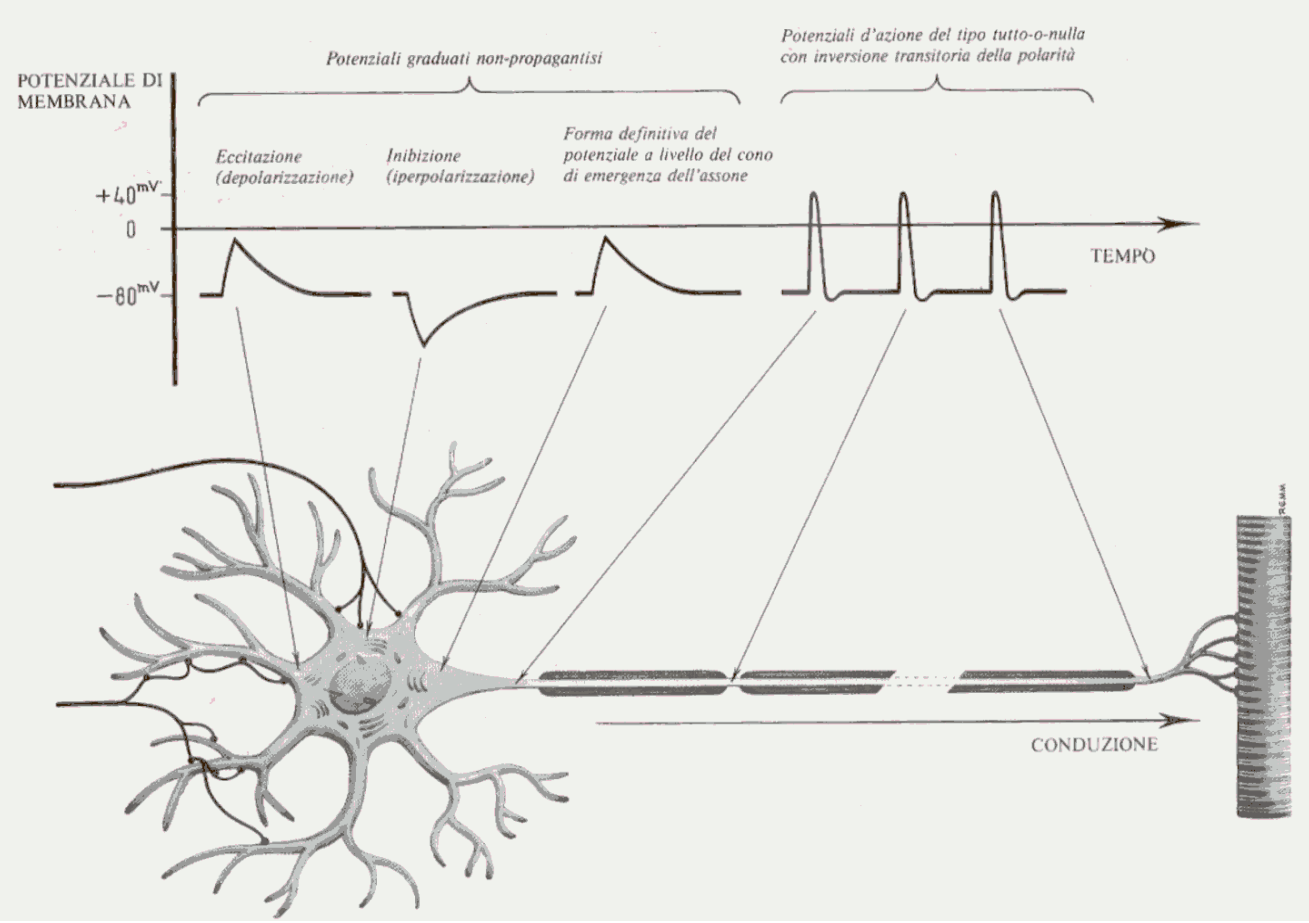
Nella figura sotto riportata sono illustrate le configurazioni dei vari tipi di neuroni.



1: neurone pseudounipolare di un ganglio sensitivo;
2: neurone bipolare;
3: neurone stellato lisodendritico), con 4-5 e 11 che sono varianti di questo tipo;
6: neurone piramidale della corteccia cerebrale, con un dendrite apicale, numerosi dendriti ed un assone basali e collaterali assonici ricorrenti;
7: neurone di Puukinje della corteccia cerebrale;
8: neurone di golgi della corteccia cerebrale;
9 e 10: cellule amcrine, prive di assone;
12: neurone glomerulare (cellula mitrale) del bulbo olfattivo, con estremità dendritiche incurvate.

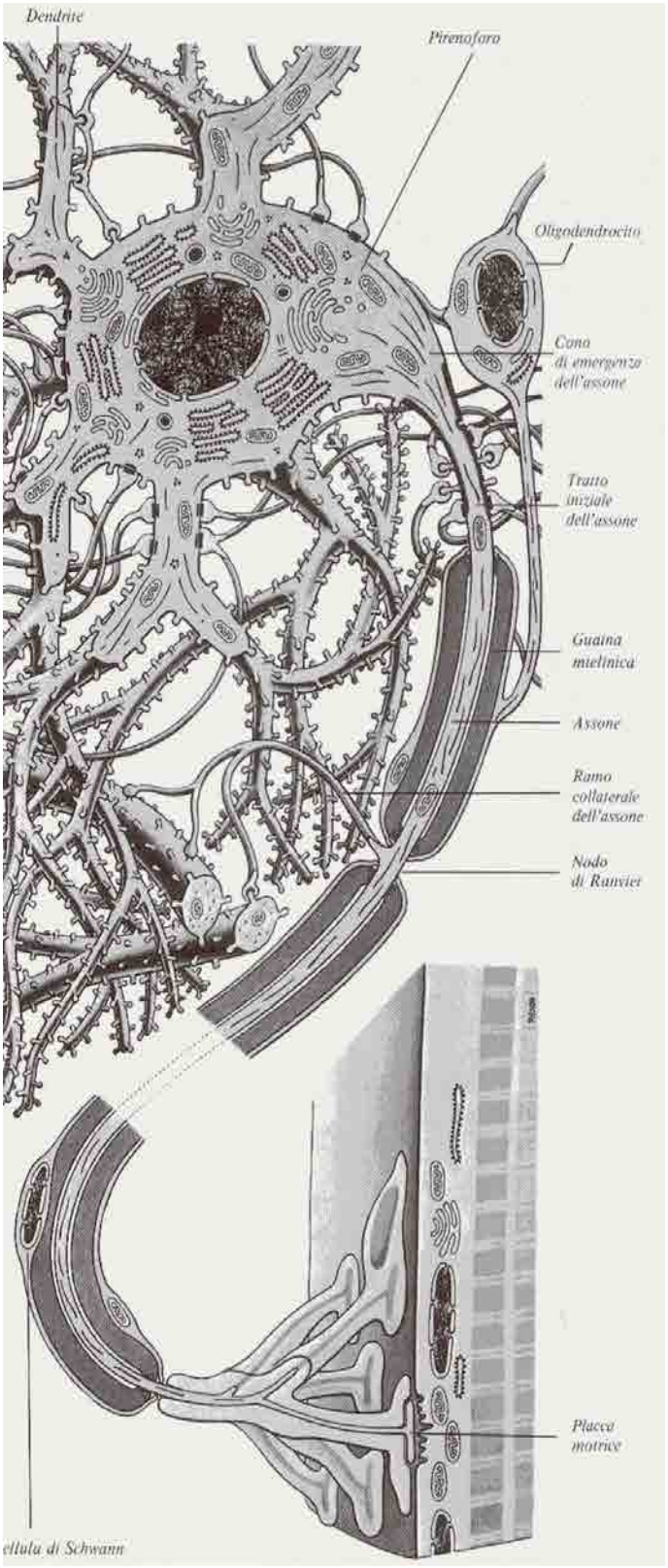
Proprietà fisiologiche nei neuroni
Tipica dei neuroni è la capacità di ricevere, condurre e trasmettere informazioni, codificate sotto forma di modificazioni elettrochimiche transitorie del loro plasmalemma; tali modificazioni consistono in rapidi afflussi di ioni attraverso il plasmalemma, che vengono a mutare una condizione di base, rappresentata dalla differenza di potenziale elettrico esistente, a riposo, tra i due versanti del plasmalemma stesso.

Vedere figura sotto riportata:



***I tipi di modificazione potenziale elettrico in un neurone motore somatico**, registrabili attraverso la membrana nei punti indicati dalle frecce.*
Le sinapsi eccitatorie ed inibitorie presenti sulla superficie dei dendriti e del pirenofero provocano circoscritte modificazioni graduate di potenziale, che si sommano a livello del cono di emergenza dall'assone e possono, secondo la legge del tutto o nulla, far insorgere una successione di potenziali d'azione; questi, a loro volta, vengono condotti lungo l'assone fino ai terminali effettori.

Ultrastruttura dei neuroni
Si distinguono parti formate in prevalenza da pirenofori e dendriti (sostanza grigia) e pari in cui predominano gruppi regolari di fibre nervose o fasci di fibre (sostanza bianca); nella sostanza grigia, intorno ai pirenofori, vi è una struttura complessa costituita da terminali assonici, dendriti, corpi e prolungamenti nevrogliali e denominata **neuropilo.**
Il citoplasma di un pirenoforo tipico è ricco di reticolo endoplasmatico liscio e granulare e poliribosomi liberi, questi ultimi spesso raccolti in ammassi voluminosi aderenti alle membrane del reticolo e visibili al microscopio-luce come **corpi o zolle di Nissl o granuli cromofori,** basofili per il loro contenuto di RNA; questi sono molto più evidenti nelle grosse cellule attive, come i neuroni motori somatici spinali, dove si osservano pile di reticolo endoplasmatico granulare.



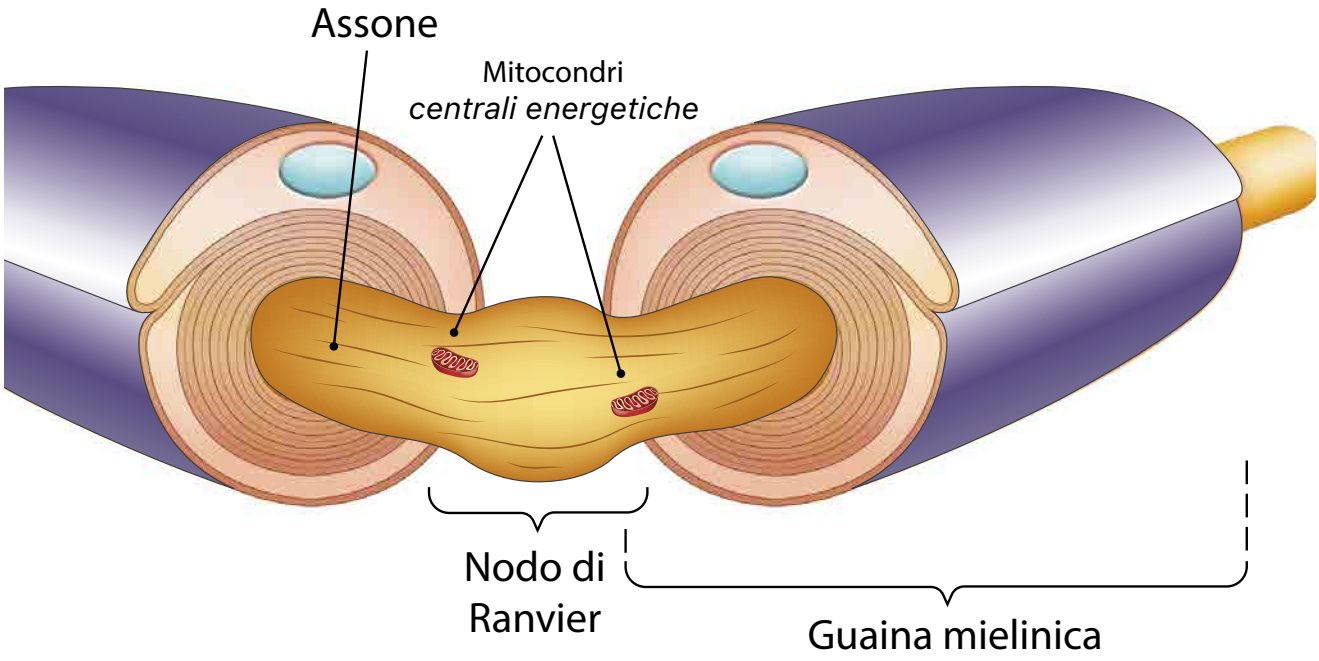
***Disegno schematico dell'ultrastruttura di un neurone somatico**, che ne mostra il perinofero e parte dell'albero dendritico (in alto, a sinistra).*
I dendriti sono coperti di spine, in contatto con tipi differenti di terminali sinaptici.
Il citoplasma del pirenofero contiene pile di cisterne del reticolo endoplasmatico granulare ed altri organuli.

Il nucleo è di solito voluminoso, sferoidale, eucromatico, con uno o più nuclei di grosse dimensioni, come in tutte le cellule impegnate in una rilevante attività di sintesi proteica.
I lisosomi si trovano in moderata quantità e le pile di cisterna dell'apparato del Golgi formano gruppi distinti, soprattutto alla base dei più grossi dendriti e del collicolo assonico.
Neurofilamenti e neurotubuli sono abbondanti; fasci dei primi corrispondono alle neurofibrille della microscopia-luce; entrambi si trovano nel pirenoforo, ma anche nei dendriti e negli assoni.
I dendriti di solito sono più ricchi di microtuboli dell'assone, che può essere quasi completamente occupato da microfilamenti.
Singoli neurotuboli e neurofilamenti non si ramificano, mentre lo fanno, nei punti di suddivisione dei prolungamenti neuronali, i loro fasci. Anche nei neuroni, come nella maggior parte delle cellule , sono stati descritti microfilamenti di actina.
Di solito nel citoplasma dei neuroni si trovano anche altri inclusi, **granuli di pigmento** sono caratteristici di talune parti dell'encefalo; ad esempio, i neuroni della sostanza nera contengono neuromelanina, probabilmente prodotto residuo della sintesi di catecolamine.

Introduzione: Sclerosi Multipla
La sclerosi multipla, o sclerosi a placche, è una grave malattia del sistema nervoso centrale, cronica e spesso progressivamente invalidante.
Può presentarsi durante quasi tutto l'arco della vita, tra i 15 e i 50 anni, anche se questa malattia si manifesta soprattutto tra i giovani adulti, tra i 20 e i 30 anni, e tra le donne, in un rapporto di due a uno rispetto agli uomini.
Ogni anno si verificano 1.800 nuovi casi. Oggi è possibile formulare una rapida diagnosi della malattia, ma la strada per trovare una cura risolutiva è ancora lunga.

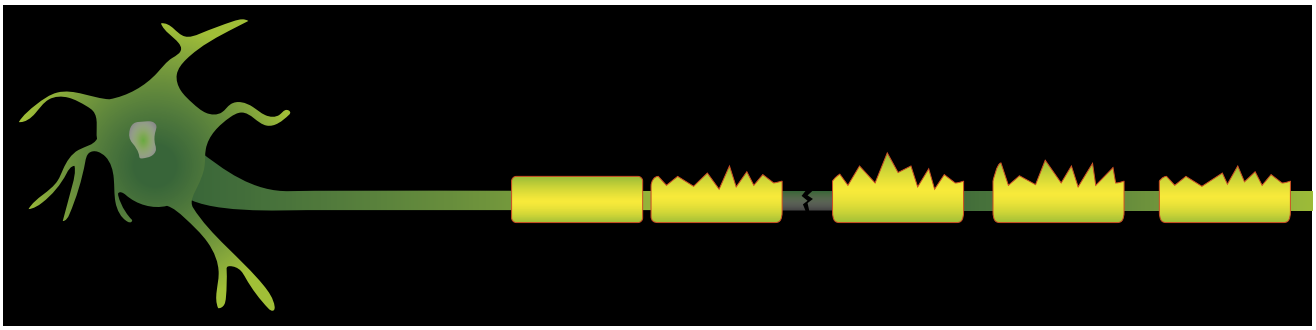
La sclerosi multipla, anche siglata SM o MS (multiple scleroris), è una malattia che colpisce il sistema nervoso centrale, cioè cervello e midollo spinale.
Viene anche denominata sindrome da demielinizzazione o demielinizzante, poiché caratterizzata da una progressiva degenerazione/distruzione della mielina. Quest'ultima è una sostanza costituita da acidi grassi (perciò di colore bianco), che detiene un ruolo fondamentale del funzionamento del sistema nervoso centrale.
La mielina riveste, come una guaina, le fibre nervose permettendo la trasmissione rapida e integra degli impulsi (messaggi o comandi) che dal cervello e dal midollo spinale, si dipartono verso le altre parti del corpo e viceversa dalla periferia vanno al centro.
La distruzione delle guaine mieliniche nel sistema nervoso centrale, causa il blocco o il rallentamento della normale conduzione degli impulsi nervosi comportando il manifestarsi di una estrema varietà di sintomi propri di questa malattia.
Le zone in cui la mielina è stata danneggiata o distrutta vengono anche dette "placche" o aree di demielinizzazione. Tali aree nel tempo vanno incontro ad un processo di indurimento, o meglio di cicatrizzazione. Da qui nasce il nome di sclerosi multipla: "sclerosi" per la presenza di lesioni cicatrizzate (le placche), "multipla" per il fatto che le lesioni possono interessare varie zone del sistema nervoso centrale.
Date le sedi multiple delle placche ne consegue un quadro clinico importante e vario.
Il danno a carico del SNC è rappresentato dalla demielinizzazione che consiste nella scomparsa della mielina, la sostanza fondamentale della guaina che riveste gli assoni delle fibre nervose. Nel SNC, la mielina viene prodotta dagli oligodendrociti e risulta costituita da lamelle lipidiche sovrapposte che formano manicotti interrotti da nodi, i nodi di Ranvier contenente Mitocondri, enzimi con alto grado di affinità, fondamentali per regolare il segnale di comando verso il midollo spinale (***Figura 1***).
La mielina è fondamentale nella trasmissione degli impulsi nervosi poiché, attraverso un meccanismo di tipo "saltatorio" da un nodo di Ranvier all'altro, rende la conduzione dello stimolo lungo la fibra nervosa più rapida ed efficace rispetto alle fibre non mielinizzate.
La progressiva degradazione della mielina in diversi punti del SNC tipica della SM si esprime con manifestazioni cliniche di estrema variabilità, dato che la distruzione delle guaine mieliniche rallenta o blocca la trasmissione degli impulsi nervosi lungo le fibre del cervello e del midollo spinale.

Figura 1



Le aree della sostanza bianca interessate dal processo di rimozione del rivestimento mielinico delle fibre nervose prendono il nome di "placche" di demielinizzazione che rappresentano il substrato anatomo-patologico della SM (***Figura 2***). Queste lesioni presentano una forma irregolare, più spesso ellissoidale, con l'asse maggiore centrato su una venula ed una distribuzione multifocale.
Le "placche" di demielinizzazione hanno una distribuzione topografica preferenziale perché si localizzano con maggior frequenza a livello della sostanza bianca situata attorno ai ventricoli laterali, nel troncoencefalico, nel cervelletto e nel midollo spinale e possono estendersi anche in corrispondenza della sostanza grigia.

Figura 2. *Placche di demielinizzazione*



Trattamenti terapeutici
Attualmente la medicina convenzionale non dispone di una cura definitiva alla sclerosi multipla. E' difficile determinare gli effetti terapeutici di trattamenti sperimentali essendo una malattia caratterizzata per la maggior parte dei casi da remissioni spontanee. I farmaci oggi impiegati sono sperimentali , ma ancora non rappresentano una soluzione al problema.
Il fatto di non essere ancora a conoscenza delle cause prime della malattia, rappresenta un forte limite a nuove prospettive terapeutiche; inoltre l'estrema variabilità della malattia comporta risposte altrettanto variabili alle terapie cliniche, con particolare riferimento ai farmaci immunomodulatori ed immunosoppressori. Un ulteriore limite sta nel fatto che fattori di previsione e di definizione della risposta clinica risultano ancora non ben definiti.
Tutte le attuali ricerche sono proiettate verso terapie multiple, cioè trattamenti terapeutici con più farmaci, in modo combinato o in sequenza.
In passato, il trattamento principale della sclerosi multipla era rappresentato da farmaci antinfiammatori steroidei quali l'adrenocorticotropina (conosciuto come ACTH), il prednisone, il metilprednisolone, il prednisolone, il betametasone ed il dexametasone.
I corticosteroidi non sono impiegati in trattamenti a lungo termine del malato con SM, anzi, generalmente i derivati del cortisone vengono somministrati ad elevati dosaggi per brevi periodi (giorni) per ridurne gli effetti collaterali che risulterebbero, invece, più gravosi in seguito a trattamento prolungato.

"Induzione della rimielinizzazione assonale nella Sclerosi Multipla"
Le fibre nervose (assoni) rendono possibile la comunicazione tra cellule nervose (neuroni) attraverso impulsi elettrici. Questa loro capacità è subordinata alla presenza di una guaina isolante avvolta intorno alle fibre nervose, nota come mielina, formata da cellule dette oligodendrociti. Gli oligodendrociti e la guaina mielinica sono i principali bersagli del processo patologico della SM.
La perdita di oligodendrociti implica quindi la demielinizzazione. La conseguenza è una notevole perdita di efficienza degli assoni nel condurre gli impulsi. Tuttavia, la demielinizzazione può essere seguita da un processo spontaneo rigenerativo o cicatrizzante nel quale nuova guaina mielinica si avvolge agli assoni. Il processo è chiamato rimielinizzazione o riparazione mielinica, che permette agli assoni di ristabilire una conduzione efficiente degli impulsi. Nella prima fase di malattia, quando la degenerazione assonale non è ancora rilevante, il danno demielinizzante tende a ripararsi spontaneamente, almeno in parte. Tale riparazione avviene attraverso diversi meccanismi, come la

spontanea riduzione e scomparsa dell'infiltrato infiammatorio, la rimielinizzazione, il reclutamento di vie nervose alternative e anche di altre aree di neuroni della corteccia cerebrale chiamate a vicariare la funzione colpita. La rimielinizzazione è il processo attraverso il quale nuovi strati di mielina si formano intorno agli assoni demielinizzati e ne ripristinano la capacità di trasmettere l'impulso nervoso. Questo processo riparativo è tuttavia non perfetto, e comunque limitato alle fasi iniziali della malattia.
La rimielinizzazione è sostenuta da precursori degli oligodendrociti presenti nelle lesioni di SM, gli enzimi sono i componenti fondamentali dei mitocondri (presenti nei nodi di Ranvier), essi catalizzano le numerose reazioni per il mantenimento e la regolazione dei segnali nervosi, la demielinizzazione, la disabilità dei sistemi motori ecc. E' indice di enzimopatia mitocondriale che nella peggiore dei casi si evolve in **atrofia muscolare spinale** conosciuta come malattia dei motoneuroni.
Dalle ricerche effettuate dall' Università di Roma Tor Vergata, Department of medicine, Moscow, Russia, Department SPES, University of Molise, utilizzando prodotti Citozym, Citovigor ecc. denominati componenti enzimatici con amminoacidi L (levogiro) cioè biosintetizzati, i componenti muniti di gruppi fosforilati, riattivano i successivi enzimi mitocondriali degli assoni riattivando i nuovi segnali fra neuroni e motoneuroni.
La rimielinizzazione è mediata da una popolazione di proteine elaborate dall' apparato del Golgi, chiamate staminali. Queste proteine sono i componenti cellulari che vengono definiti cellule progenitrici degli oligodendrociti. In caso di demielinizzazione, queste cellule si attivano e rispondono ai fattori generati dalla demielinizzazione muovendosi e riproducendosi. In poco tempo l'area di remielinizzazione viene riempita da cellule progenitrici degli oligodendrociti. Successivamente avviene la trasformazione di queste cellule in oligodendrociti che formano nuova guaina mielinica attorno agli assoni demielinizzati. Questo processo è detto differenziamento.
A volte la rimielinizzazione non funziona per un errore nel reclutamento di cellule progenitrici degli oligodendrociti oppure nel loro differenziamento. Il differenziamento sembra essere il più complesso dei due processi, quindi è quello che più probabilmente cadrà in errore.
Recenti sperimentazioni mostrano come la causa comune della mancata rimielinizzazione nei pazienti con SM non è l'assenza di cellule progenitrici degli oligodendrociti, ma il loro mancato differenziamento in oligodendrociti capaci di rimielinizzare. Due sono le possibili spiegazioni del mancato differenziamento che possono verificarsi singolarmente o contemporaneamente: mancanza di fattori che lo promuovono o la presenza di fattori che lo inibiscono, come sostanze chimiche o fattori energetici non riconosciuti dagli enzimi mitocondriali. Pertanto scoprire la vera causa che hanno indotto alterazioni così devastanti, è opera impossibile. Ribadiamo ancora una volta che il mondo scientifico procede con numerose ricerche: chimiche, fisiche, chimico-fisiche, molecolari e nanosistemi.
Per ottenere i propri prodotti, **Citozeatec** ha sviluppato, da diversi anni, tecnologie mediante conversioni enzimatiche, denominate "Biodinamiche", tenuto conto che il metabolismo cellulare utilizza numerosi cicli per sintetizzare la specificità dei componenti per i numerosi distretti.

Polisaccaridi e proteoglicani

La maggior parte dei carboidrati è presente in natura sottoforma di polisaccaridi, polimeri con una massa molecolare molto elevata; i polisaccaridi, chiamati anche glicani, differiscono fra loro per il tipo di unità saccaridica ricorrente, per la lunghezza della catena, per il tipo di legame glicosidico che unisce le unità e per il grado di ramificazione.
Nei tessuti degli animali, lo spazio extracellulare, è riempito da una sostanza gelatinosa, la matrice cellulare, detta anche sostanza, che tiene unite le cellule di un tessuto e contiene numerosi pori attraverso cui passano e diffondono le sostanze nutrienti e l'ossigeno verso le singole cellule.
La matrice extracellulare è composta da un intreccio di eteropolisaccaridi e di proteine fibrose; gli eteropolisaccardidi, chiamati glicosoaminoglicani, sono una famiglia di polimeri lineari costituiti da una ripetizione di unità disaccaridiche.

DOSI CONSIGLIATE AD INTEGRAZIONE DELLA TERAPIA MEDICA PRESCRITTA

Dal giorno 1 al giorno 10

- Citozym: 1 cucchiaio (7 ml ca.) - Al mattino, prima di colazione
- Ergozym Plus: 1 stick - A colazione
- Citozym: 2 cucchiai (14 ml ca.), sciolti in un bicchiere d'acqua - Alla sera, prima di coricarsi

Dal giorno 11 al giorno 150

- Citovigor: 1 stick - A colazione
- Citozym: 60 ml con Propulzym: 1 stick, sciolti in mezzo litro d'acqua - Consumare a sorsi durante la giornata (dalle 8:00 alle 22:00)
- Mineral P-450: 1 stick - Alle ore 10:00, lunedì, mercoledì, sabato
- Probiotic P-450: 1 stick - Alle ore 10:00, martedì, giovedì, domenica
- Athletic Fresh - Applicare la crema sulle zone interessate: gambe, braccia e colonna vertebrale - Tutte le sere

N.B. *La trasformazione dei cataboliti elaborati dai nostri enzimi lisosomiali può produrre sostanze di scarto, eliminate sottoforma di gas CO2 (anidride carbonica) o sottoforma di liquidi (dissenteria), fenomeno che scompare allo scomparire della tossicità. (Trasformazione delle sostanze di deposito nel sistema circolatorio, vascolare ecc.)*

Nota: I prodotti Citozeatec sono elaborati da enzimi specifici (substrati) copiati dalle cellule umane. Tutto ciò garantisce la replicazione della cellula e dei suoi componenti: acidi nucleici, RNA, telomerasi, ecc., in contrasto con la senescenza. Le alterazioni enzimatiche portano a numerose malattie, come già a suo tempo scoperto dallo scienziato J.B. Sumner-1926, il quale ha dimostrato che le nostre cellule hanno un periodo di vita inferiore ai 10 anni.

GLI INTEGRATORI ALIMENTARI BIODINAMICI NON SONO FARMACI

3

HCV

3.1 HCV - Ricerca Uniroma 2

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
LABORATORIO DI ONCOLOGIA SPERIMENTALE E ISTOLOGIA

Relazione scientifica finale - 13 Ottobre 2014

Effetto epatoprotettivo della somministrazione di Citexivir in pazienti con epatite cronica da HCV

Introduzione

L'**epatite C** è una malattia infettiva, causata dall'*Hepatitis C virus* (HCV), che colpisce in primo luogo il fegato. L'infezione è spesso asintomatica, ma la sua cronicizzazione può condurre alla cicatrizzazione del fegato e, infine, alla cirrosi epatica, che risulta generalmente evidente dopo molti anni. In alcuni casi, la cirrosi epatica può condurre ad altre patologie. L'HCV è trasmesso principalmente per contatto diretto con il sangue infetto, spesso dovuto all'uso di droghe per via endovenosa, a presidi medici non sterilizzati e trasfusione di sangue. Si stima che circa 130-170 milioni di persone al mondo siano infettate dal virus dell'epatite C. L'esistenza dell'epatite C, in origine definita "epatite non A non B", è stata ipotizzata nel 1970 e confermata nel 1989.
Il virus persiste nel fegato di circa l'85% delle persone infette. Questa infezione persistente può essere trattata con farmaci quali l'interferone α e la ribavirina, che rappresentano la terapia di riferimento. Complessivamente il 50-80% dei pazienti trattati guarisce, mentre coloro che sviluppano cirrosi o cancro possono necessitare di un trapianto di fegato. Al 2014 nessun vaccino efficace contro l'epatite C è ancora disponibile.

Metodi

Studio clinico a doppio cieco, con placebo, condotto per **12 settimane**, su di un totale di **36 pazienti** di sesso maschile con epatite cronica istologicamente confermata, da infezione da **HCV genotipo 1** (frequenza ca. 60%), e livelli persistentemente elevati di Alanina Aminotrasferasi (ALT) di Aspartato Aminotrasferasi (AST) e di Gamma-Glutamil-trasferasi (GGT)1.

1. Bani-Sadr, F. Lapidus, N; Rosenthal, E; Gerard, L; Foltzer, A; Perronne, C; Cacoub, P. Gamma Glutamyl Transferase Elevation in HIV/Hepatitis C Virus-Coinfected Patients During Interferon-Ribavirin Combination Therapy JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2009, 50(4),429-430

Trattamento

3 gruppi di trattamento: **Gruppo A** (12 pazienti): **Controlli-placebo**, somministrazione di una soluzione di saccarosio (10g/100 ml in acqua) secondo protocollo sperimentale (1). **Gruppo B** (12 pazienti): **Trattati a bassa dose**, trattamento per via orale secondo protocollo 1 (1:4 v/v). **Gruppo C** (12 pazienti): **Trattati ad alta dose,** trattamento per via orale secondo protocollo 2 (1:2 v/v).

Controlli

L'efficacia del trattamento è stata valutata attraverso il monitoraggio delle modifiche delle attività circolanti di **ALT, AST e GGT** come markers del danno epatico. Inoltre è stato dosato il titolo virale per mezzo del **HCV-RNA** confrontato con i livelli del saggio **anti-C100-3**. La sicurezza e la tollerabilità del trattamento sono state valutate sulla base degli eventi clinicamente avversi e risultati dei test di laboratorio[2]

2. Chien D.Y. et al.Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection using an immunodominant chimeric polyprotein to capture circulating antibodies: reevaluation of the role of HCV in liver disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 89(21):10011-5.

Risultati

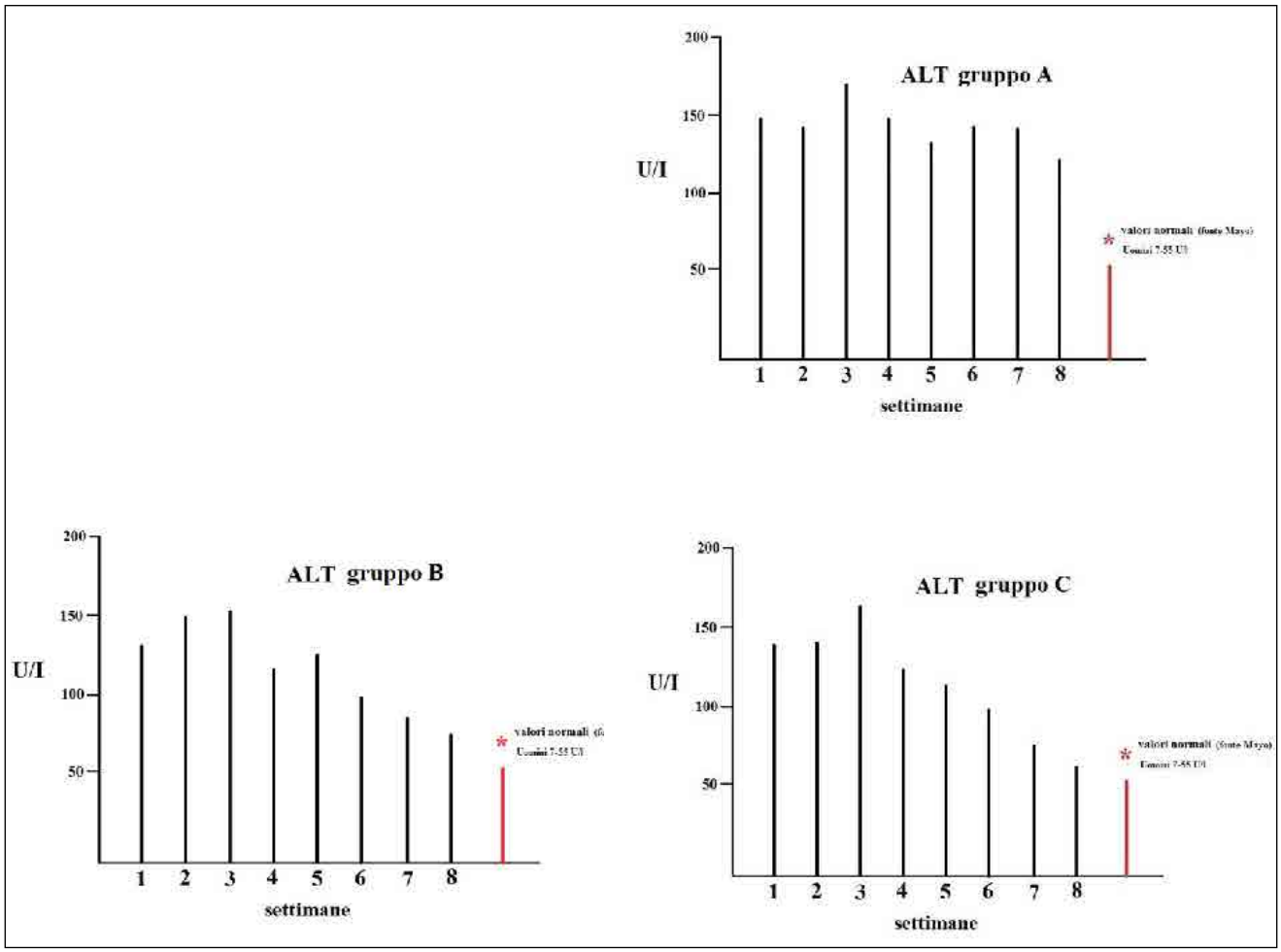
Tutti e 36 pazienti erano infettati da **HCV genotipo 1** e hanno completato lo studio senza alcuna violazione del protocollo sperimentale. Tutti e 36 pazienti risultavano sotto terapia farmacologica.

- 10 pazienti seguivano la terapia con **interferone** α **e ribavirina**,
- 20 pazienti erano trattati con **boceprevir (*Victrelis*)**
- 6 pazienti trattati con **interferone** α**, ribavirina e telaprevir (*Incivo*).**

Risultati Alanina Aminotrasferasi ALT

I valori presentati in ***Figura 1***, sono stati ottenuti dalla media dei 12 valori di attività di ogni paziente analizzata per ogni settimana. Le variazioni dalla media non hanno mai superato il 15%. E' evidente la riduzione dei valori enzimatici a partire dalla 4ª settimana di trattamento. Il gruppo B ha raggiunto dopo 8 settimane di trattamento una riduzione dei valori di ALT del **36**%, mentre il gruppo C ha raggiunto nello stesso periodo una riduzione del **46**%. La curva di riduzione appare molto regolare nel gruppo C quando comparato con il gruppo B.

Figura 1



Risultati Aspartato Aminotrasferasi AST

I valori enzimatici relativi ad AST, di norma non subiscono ampie variazioni durante l'infezione da HCV. Ovviamente il dato può variare negli individui. I valori presentati in ***Figura 2***, sono stati ottenuti dalla media dei 12 valori di attività di ogni paziente analizzata per ogni settimana. Le variazioni dalla media non hanno mai superato il 15%. E' evidente la riduzione dei valori enzimatici a partire dalla 6ª settimana di trattamento. Il gruppo B ha raggiunto dopo 8 settimane di trattamento una riduzione dei valori di ALT del **41**%, mentre il gruppo C ha raggiunto nello stesso periodo una riduzione del **59**%.
La curva di riduzione appare simile nei due gruppi analizzati.

Figura 2

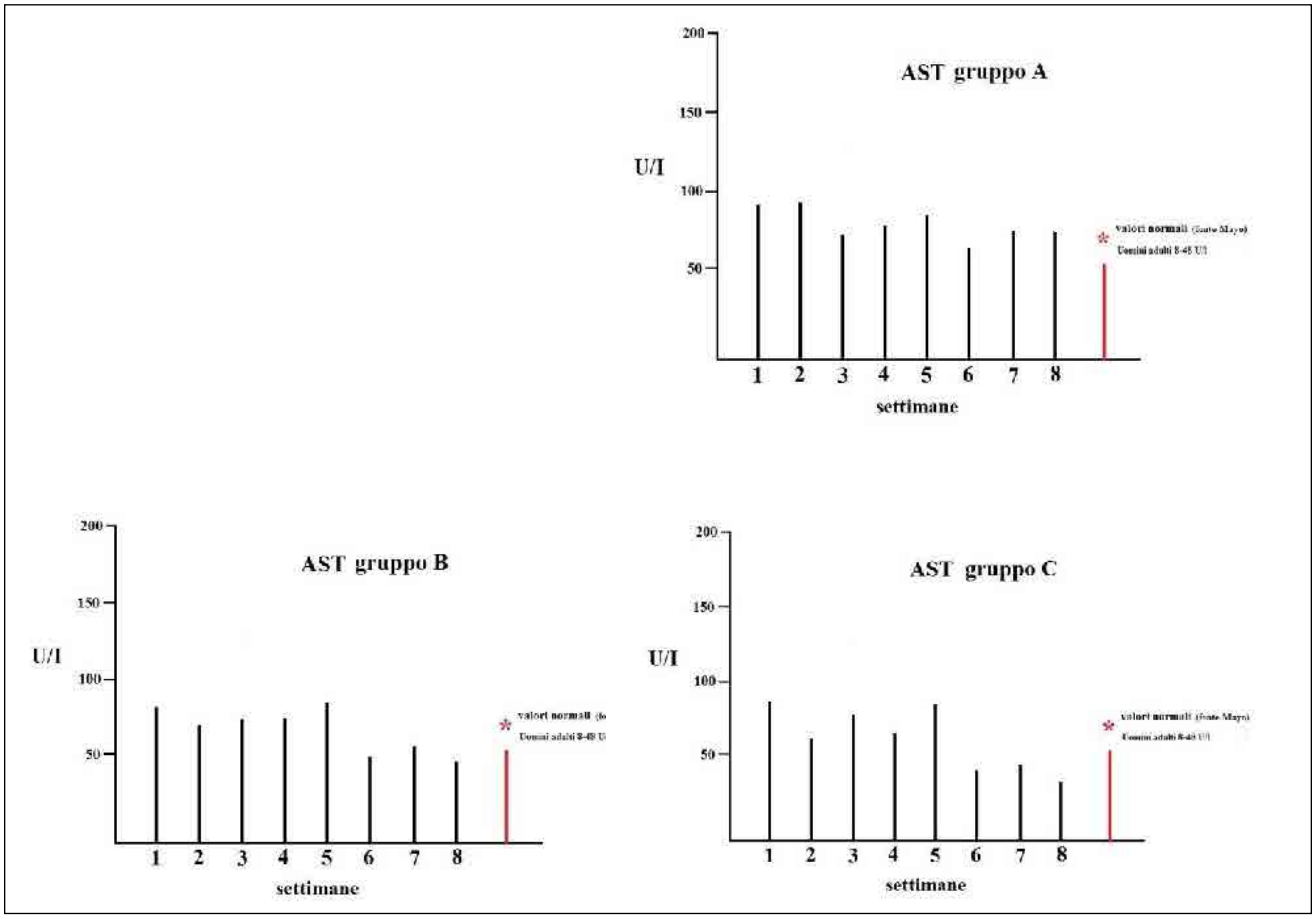
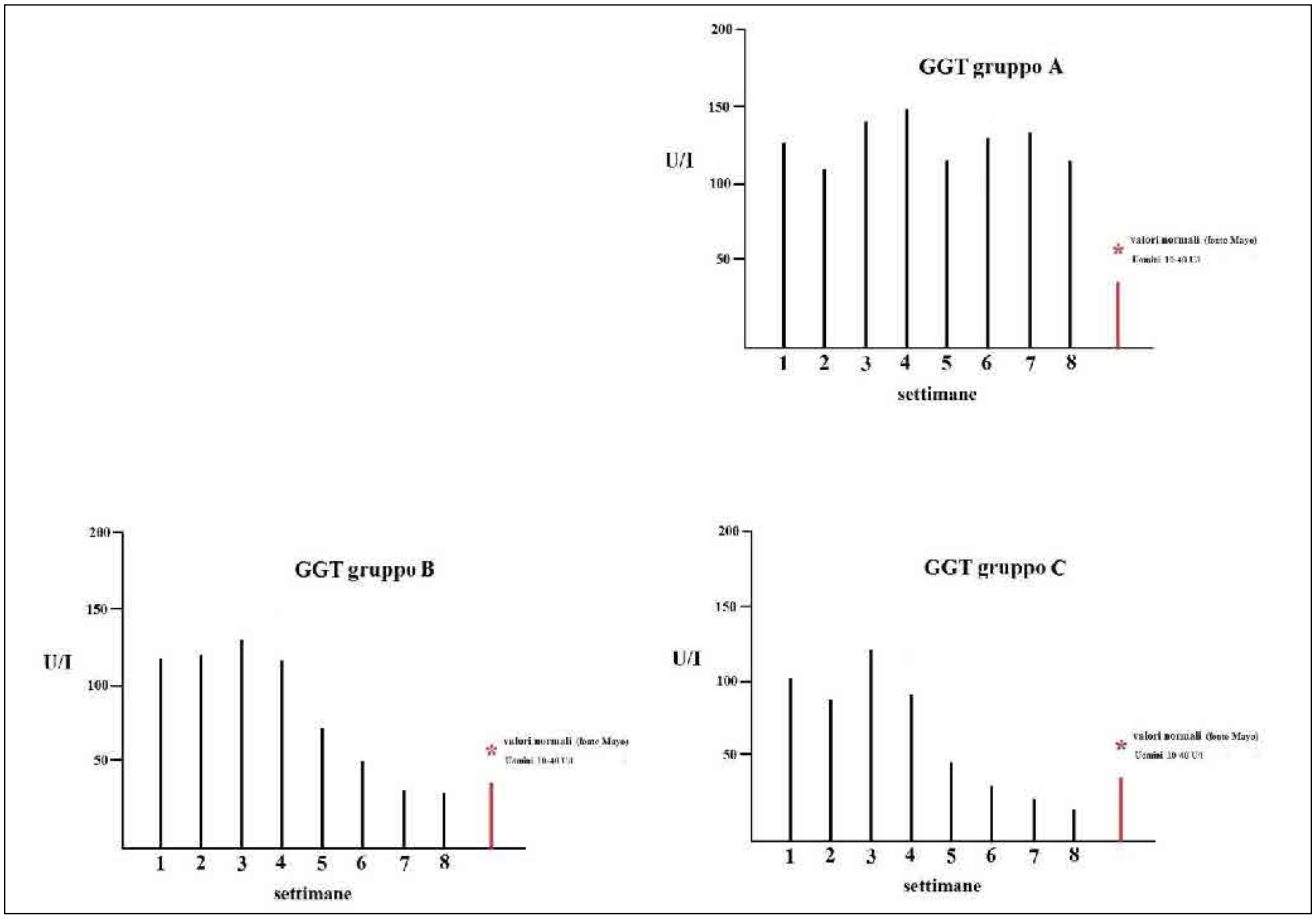


Figura 3



Risultati Gamma glutamil transferasi - GGT

I valori enzimatici relativi al GGT, di norma subiscono ampie variazioni durante l'infezione da HCV. E' anche noto che il trattamento farmacologico non riesce a ridurre tali livelli enzimatici in tempi brevi. La ***Figura 3***, mostra i valori ottenuti dalla media dei 12 valori di attività di ogni paziente analizzata per ogni settimana nel gruppo specifico. Le variazioni dalla media non hanno mai superato il 15%.
Anche in questo caso è evidente la riduzione dei valori enzimatici a partire dalla 5ª settimana di trattamento per il gruppo B e dalla 4ª per il gruppo C. Il gruppo B ha raggiunto dopo 8 settimane di trattamento una riduzione dei valori di GGT del **72%**, mentre il gruppo C ha raggiunto nello stesso periodo una riduzione del **84%**. La curva di riduzione appare simile nei due gruppi analizzati.

Risultati saggio HCV-RNA

I pazienti trattati (24 unità) e non trattati (12 unità) sono stati sottoposti al saggio del HCV-RNA.
Lo RNA del virus dell'epatite C comprende geni che codificano per proteine strutturali e non.
L'HCV-RNA è espressione della replicazione del virus e compare nel siero qualche giorno prima dei segni di danno epatico, alcune settimane o mesi prima della comparsa dell'anti C-100-3. Si rileva mediante la tecnica della PCR. Il test è estremamente sensibile e presenta pertanto elevati falsi positivi. Per la sua costante positività il saggio deve essere ripetuto frequentemente per una valutazione del decorso della malattia. 20 pazienti presentavano inizialmente valori di HCV-RNA superiori a $1x10^6$ U.I./ml. 16 pazienti presentavano valori di HCV-RNA in un intervallo da $8x10^5$ a $1x10^6$ U.I./ ml. I risultati in tabella sono espressi come percentuale di riduzione rispetto ai controlli posti a 100. Si evince una riduzione del titolo virale del **30%** nel gruppo A e del **48%** nel gruppo B.

Risultati saggio anti-C100-3

La positività del saggio anti-C100-3 è stata ottenuta nel 40% dei casi osservati e giudicata non significativa nei confronti del trattamento effettuato.

Gruppi	ALT	AST	GGT	HCV-RNA
Gruppo A	100%	100%	100%	100%
Gruppo B	36%	41%	72%	30%
Gruppo C	46%	59%	84%	48%

Tabella 1 - riassuntiva:
Riduzione percentuale dei valori enzimatici e della viremia in pazienti affetti da epatite da HCV. I valori rappresentano la media percentuale di riduzione rispetto al controllo (gruppo A) posto a 100.

Conclusioni

Dai dati sperimentali ottenuti si evince che il trattamento per via orale con Citexivir, di pazienti affetti da infezione di HCV genotipo 1, influenza marcatamente i valori di tre attività enzimatiche marker di sofferenza epatica. In particolare l'attività enzimatica sensibilmente ridotta concerne la GGT. Le attività ALT e AST vengono anche loro ridotte sensibilmente. I dati presentati mostrano anche la riduzione della replicazione virale ottenuta con il saggio del HCV-RNA. Inoltre viene dimostrata la bassa attendibilità della ricerca dell'anti-C100-3, come riportato da diversi autori[2]. La presente ricerca non ha la pretesa di suggerire il trattamento riportato come terapia per la cura dell'infezione da HCV, ma i dati ottenuti potrebbero tendere verso la possibilità di somministrazione di un integratore alimentare come Citexivir a supporto della terapia farmacologica ufficiale.

Roma, 14/10/2014

Dott. Francesco Antonelli

Prof. Simone Beninati

American Journal of Clinical and Experimental Medicine
2015; 3(4): 137-141
Published online June 3, 2015 (http://www.sciencepublishinggroup.com/j/ajcem)
doi: 10.11648/j.ajcem.20150304.12
ISSN: 2330-8125 (Print); ISSN: 2330-8133 (Online)

Effect of Oral Administration of Dietary Antioxidant Supplements in Patients with Chronic Hepatitis C

Torricelli Piera[1], Antonelli Francesco[2], Ferorelli Pasquale[2], De Martino Angelo[2], Shevchenko Anna[3], Beninati Simone[2]

[1]Department SPES, University of Molise, Campobasso, Italy
[2]University of Tor Vergata, Department of Biology, Rome, Italy
[3]People's Friendship University of Russia, Department of Sciences, Moscow, Russia

Email address:
beninati@bio.uniroma2.it (S. Beninati)

To cite this article:
Torricelli Piera, Antonelli Francesco, Ferorelli Pasquale, De Martino Angelo, Shevchenko Anna, Beninati Simone. Effect of Oral Administration of Dietary Antioxidant Supplements in Patients with Chronic Hepatitis C. *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*. Vol. 3, No. 4, 2015, pp. 137-141. doi: 10.11648/j.ajcem.20150304.12

Abstract: In a prospective, randomized and single-blinded clinical trial, we compared patients with Chronic hepatitis C (CHC) orally treated with sucrose diluted with water (1:2) twice a day for 56 days (control group), with patients orally treated with four antioxidant dietary supplements rich in vitamin B5, B9, C, D, citric, pyruvic, and tartaric acids and carbohydrates (CCEP: Citexivir, Citozym, Ergozym Plus and Propulzym). The efficacy of treatment was evaluated once a week for 8 weeks, by monitoring changes in the activities of circulating Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST) and Gamma-glutamyl transferase (GGT) as markers of liver damage. After a treatment of 84 days the viral title was evaluated through the HCV-RNA compared with the levels of anti-C100-3. The security and tolerability of the treatment were evaluated on the basis of clinical adverse events and results of laboratory tests. The experimental data obtained showed that the oral treatment of patients suffering from HCV infection of genotype 1, with CCEP, markedly influenced the values of the three enzymatic markers of hepatic disease. The data presented also showed the reduction of viral replication evidenced by the rate of HCV-RNA levels. As reported by others, we confirmed the low reliability of the research of anti-C100-3. This research is not meant to suggest the treatment reported as a therapy for the treatment of HCV infection, but data obtained may tend towards the possibility of administration of a dietary supplement such as CCEP in support of the official drug therapy of CHC in the nutritional care of HCV patients.

Keywords: Antioxidant Food Supplements, Oxidative Stress, Chronic Hepatitis C, HCV

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is considered an important public health problem [1] and is the leading cause of liver transplantation in the Western world. Chronic HCV infection increases the risk for hepatic steatosis, insulin resistance, glucose intolerance and type 2 diabetes[2].

The molecular mechanism of HCV pathogenesis and the cause of progression of liver disease to severe liver injury are still poorly understood. Oxidative stress has emerged as a key player in the development and pathogenesis of chronic HCV [3]. Indeed, several experimental evidences suggest that oxidative stress contributes to steatohepatitis and that the increased generation of reactive oxygen and nitrogen species, together with the decreased antioxidant defense, promotes the development of hepatic and extrahepatic complications of HCV infection. The principal mechanism causing oxidative stress in HCV-positive subjects is derived by the direct activity of HCV proteins in increasing mitochondrial ROS production, as key events [4]. Cells are protected against oxidative insults by natural antioxidant products, notably glutathione, and by diverse antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSHPx) [5]. Oxidative stress develops when the disturbance in balance between the reactive oxygen forms produced in excess, and the factors preventing their harmful effect occurs.

Antioxidants and other strategies that decrease reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS), have been evaluated in the treatment of CHC. Vitamin C, E, D, silybin–

phospholipids/vitamin E complex, and mitoquinone could each help alleviate the plasma or serum ALT, albeit to varying degrees in patients, at least before the cessation of therapy [6-8]. α-Tocopherol could also prevent hepatic stellate cell activation in hepatitis C patients [9]. Certain antioxidant cocktails used in the absence of concurrent Interferon α (IFN) therapy likewise produced favorable effects on ALT in patients [10].

Considering these factors, appropriate nutrition becomes an essential tool to minimize HCV's comorbidities such as fatty liver, inflammation and insulin resistance. Recently, functional foods have been considered essential for promoting and maintaining health [11]. The aim of this study was to evaluate the influence of some food supplements with an enhanced antioxidative capability on ALT, AST and GGT levels in non-diabetic CHC.

Our objective was extended to the evaluation of the viral replication by detection of the "viral load" under this antioxidative treatment performed by four dietary supplements with reported antioxidant properties [12].

2. Materials and Methods

2.1. Patients

Non-diabetic patients with CHC, aged between 35 and 60 years were recruited from a reference ambulatory unit of the University. The diagnosis of HCV infection was made by the presence of serum anti-HCV, which was confirmed by qualitative determination of HCV-RNA. Inclusion criteria were the following: patients aged over 18 years, with or without liver cirrhosis; patients with ethanol consumption below 20 g/d; patients with normal liver function and patients who were under antiviral therapy with IFN and Ribavirin or Telaprevir. Patients co-infected with HIV and/or HBV with renal failure as well as those with heart disease, decompensated cirrhosis, pregnancy, any malignancy, diabetes mellitus or obesity were excluded. The subjects gave written informed consent before participating in the study. The Ethics Committee of the University approved the study.

2.2. Experimental Protocol

The study was a prospective, randomized and single-blinded clinical trial. Subjects who met the inclusion criteria of the study were randomly allocated into one of two study groups. The study was single-blinded and the estimated sample size was 36 patients.

The 36 patients were equally divided into two groups (n = 18), and each group was composed of males with chronic hepatitis histologically confirmed, by infection with HCV genotype 1 (frequency ca. 60%), and persistently elevated ALT, AST and GGT. The control group (A) was supplemented with sucrose diluted in water at 50% (w/v) and the intervention group (B) was supplemented with the four dietary antioxidant supplements according to the reported protocol. In the absence of contraindications to the four supplements, group B patients were administered in increasing doses during the planned 56 days of treatment. Therefore, for the first 5 days of treatment, 10 mL of Citexivir before breakfast and after dinner. For the next 10 days, 10 mL of Citexivir before breakfast and 6.5 g of Ergozym Plus during breakfast. At night 20 mL of Citexivir dissolved in water. From day 16th until day 23rd, 6.5 g. of Ergozym Plus during breakfast and 60 mL of Citexivir dissolved in 500 mL of water to drink during the day. Finally, from day 24 until the end of treatment (day 56th), 6.5 g of Ergozym Plus for breakfast and 60 mL of Citexivir dissolved in 500 mL of water to drink during the day. After dinner 25 mL of Citozym along with 6.5 g of Propulzym dissolved in water. An accurate observation of possible adverse effects on the patient was performed. Citexivir, Citozym, Ergozym Plus and Propulzym, were obtained from CITOZEATEC, S.r.l. (Peschiera Borromeo, Milano, Italy).

Patients were instructed to dissolve the supplement in water, juice, soup, porridge or to consume it with fruits. Additionally, considering their nutritional status and dietary habits, patients received dietary guidelines to promote healthy eating and weight control. Diet counseling, aimed to promote the ingestion of a normocaloric, normoglycidic and normoproteic diet by both groups was performed .

2.3. Observation and Evaluation of Clinical Signs

Clinical survey data such as clinical diagnosis, viral genotype, necroinflammatory activity index and fibrosis (METAVIR classification) were either collected from medical records or from patient examinations. Patients underwent ultrasonography of the upper abdomen with a team of three examiners using a single piece of equipment at the University Hospital's radiology service. Hepatic steatosis was graded as mild, moderate or severe according to the classification of Saverymuttu et al [13] .

Measurement of waist circumference was performed according to the World Health Organization recommendations using an inelastic tape measure (TBW Import Ltd.) that was 0.5 cm wide and 200 cm in length. Waist circumference was measured at a level midway between the superior aspect of the iliac crests and the lower lateral margins of the ribs. The cutoff points adopted for classifying central obesity and increased risk of metabolic complications were above 80 cm for women and 94 cm for men [14]. Socio-demographic and lifestyle information were also collected using a structured questionnaire during the first appointment of follow-up.

Patients underwent follow-up visits once a week, with registered dietitians to elucidate the adherence to the diet prescription and antioxidant dietary supplements protocol. Ultrasound was also performed in patients with a diagnosis of hepatic steatosis at baseline.

2.4. Bioassays

After a 12-h fast, a blood sample was collected weekly for the determination of AST, ALT and GGT. Analyses were performed on a Beckman Coulter LX-20 PRO and CX-9

equipment. A qualitative and quantitative Hepatitis C RNA tests were used. The quantitative test performed by PCR, measures the number of copies of HCV RNA in the blood, also known as the "viral load." Quantitative measurement of "viral load" was carried out using the HCV Ampliprep TaqMan, Roche Molecular System, at the same time as ALT determination [15-16].

2.5. Statistical Analysis

Descriptive analysis was performed to characterize the population. Mann-Whitney U and Wilcoxon's rank sum tests were used to compare the biochemical values in the intervention and control groups and to evaluate the differences obtained at baseline and after intervention. Logistic regression analysis was used to evaluate risk predictor factors for hepatic steatosis, insulin resistance (HOMA-IR $\geq$ 3.0) and changes in ALT levels (1.5 above the upper limit of normal). Confounding and interaction analyses were performed to select the final models. Multiple regression analysis was performed after the intervention considering the groups had similar demographic, clinical and laboratory features before CCEP supplementation.

The sample size was calculated using an estimated 20% loss to follow-up, a confidence level of 95% and 80% power. A statistical significance was inferred at $p<0.05$. In some biochemical analyses, the Bonferroni method was applied to adjust the multiple comparisons p-value between the groups at the significance level of 0.007. Statistical analysis was performed with the statistical package R version 2.12.

3. Results

After 56 days of CCEP supplementation (Table I), a significant reduction was observed in the transaminase levels of the group B vs the group A (AST: 50%, $p <0.05$; ALT: 38%, $p<0.05$). A remarkable reduction in the levels of GGT was also observed in the group B compared to the group A (71%, $p< 0.05$).

Table I. *values of the enzymatic activities obtained during 8 weeks of treatment with CCEP of patients with CHC. In parentheses the values of the control group not treated. Data represent the mean of 18 determinations with a S.D. lower than 15%.*

WEEKS	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	GGT (IU/L)
1	85±5 (90)	139±12 (140)	106±10 (132)
2	60±7 (95)	140±15 (140)	92±6 (115)
3	75±7 (70)	160±16 (160)	120±9 (146)
4	65±6 (75)	125±13 (150)	95±8 (157)
5	80±4 (80)	110±10 (125)	50±6 (123)
6	45±2 (60)	90±5 (130)	33±2 (137)
7	50±2 (70)	75±4 (130)	48±3 (143)
8	35±2 (70)	74±7 (120)	36±4 (123)

The values presented in Figure 1, were obtained from the average of the 18 values of activity of each group analyzed for each week. The variations from the average never exceeded 15%. Group B showed the reduction of the enzyme values for ALT and GGT starting from the 4th week of treatment. AST activity starts to decrease from the 6th week of treatment. The enzyme values related to AST normally did not undergo large changes during HCV infection. Obviously, the data can vary in individuals. The values related to the enzymatic activity of GGT, normally underwent large variations during infection by HCV and the pharmacological treatment for HCV infection, failed to reduce such enzyme levels in a short time.

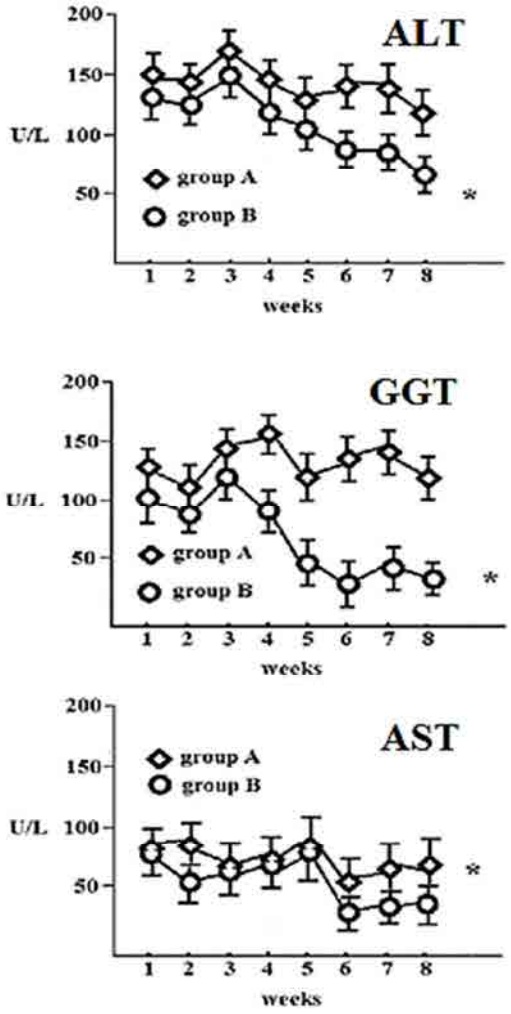


Figure 1. *reduction of enzyme levels in patients with CHC treated with CCEP for 8 weeks Data represent the mean of 18 determinations with a S.D. lower than 15%.*normal values.*

After 84 days of CCEP supplementation, treated patients (n=18 units) and untreated (n=18 units) were assayed for the HCV-RNA, AST, ALT and GGT. The RNA of the Hepatitis C virus, comprises genes encoding for structural proteins and not. The HCV-RNA expression of virus replication, appears in serum few days before signs of liver damage, a few weeks or months before the onset of the anti-C 100-3. HCV-RNA is detected by means of the PCR technique. The test is extremely sensitive and therefore has high false positives. For its constant false positivity, the test must be repeated frequently to have a real evaluation of the course of disease.

20 patients had initial values of HCV-RNA exceeding $1x10^6$ I.U. / mL. 16 patients were in a range of HCV-RNA between $8x10^5$ I.U. / mL and $1x10^6$ I.U. / mL. Results in Table II are expressed as percentage of reduction compared to controls places to 100. It shows a reduction of viral titer of 35% in group B when compared with group A. The percentage of reduction of the three activities examined appeared stabilized after 84 days of treatments at 46% for ALT, 80% for GGT and 59% for AST. A positive assay anti-C100-3 was obtained in 40% of cases observed and judged not significant in relation to the treatment carried out (data not shown).

Table II. *Changes in percentage of enzyme values and the viral titer expressed as HCV-RNA in patients treated with CCEP for 84 days. The variability of the data did not exceed 15%.*

data	group A	group B
ALT	100	46%
GGT	100	80%
AST	100	59%
HCV-RNA	100	35%

4. Discussion

HCV infection is associated with severe alterations in the host redox status. [3]. Hepatic, blood, and lymphocytic glutathione is significantly depleted [17]. Decreases in plasma antioxidant potential and in the levels of vitamins A, B, and E, zinc, and selenium and significant increases in lipid peroxidation, oxidative DNA damage, and nitrotyrosine have also been found [18]. Several sources of reactive species that contribute to oxidative/nitrosative stress during HCV infection have been identified [3]. The oxidative DNA damage induced by HCV could be alleviated by strategies designed to prevent production of nitric oxide, suggesting potential roles of hydroxyl radical and peroxynitrite/nitration in the damage [19]. Liver is a net exporter of GSH. Therefore, it is conceivable that HCV will decrease the plasma and lymphocytic GSH indirectly through primary liver injury, decreasing the total GSH output [20]. In addition, HCV has been suggested to impair the host antioxidant defense specifically. Antioxidants and other strategies that decrease ROS/RNS have been evaluated in the treatment of CHC [8,9]. Iron depletion, with or without IFN therapy, vitamin E, C and D could each help alleviate the plasma or serum ALT. Certain antioxidant cocktails used in the absence of concurrent IFN therapy likewise produced favorable effects on ALT in CHC patients [21].

The experimental data presented in our work, undertaken in order to restore the antioxidant properties of the HCV host, show that oral treatment with CCEP, a combination of four dietary antioxidant supplements [12, 22], of patients suffering from infection with HCV genotype 1, markedly influences the values of three enzymatic activities markers of hepatic disease (GGT,ALT and AST). This antioxidant treatment has also highlighted the reduction of viral replication assessed by the rate of HCV-RNA. Our research evidenced the low reliability of the values of anti-C100-3, as reported by several authors [23]. This research does not intend to suggest the treatment reported as a therapy for the treatment of HCV infection, but data obtained suggest the possibility of the use of CCEP as a dietary supplement to support the official therapy. In conclusion, CCEP supplementation decreased transaminases levels and thus may improve liver inflammation in CHC patients; it also reduced hepatic GGT in the treated group of patients but change marginally the virus title. The overall results of the experiment suggest that the blend of antioxidants used should be considered in the nutritional care of HCV patients.

Acknowledgements

We are grateful to A.I.A.S Italy, for financial support for studying the possibility of alternative therapies for CHC.

References

[1] Lauer GM, Walker, B D Hepatitis C virus infection. N. Engl. J. Med. 2001; 345(1): 41–52.

[2] Pol S, Vallet-Pichard A, Corouge M, Mallet VO. Hepatitis C: epidemiology, diagnosis, natural history and therapy. Contrib Nephrol. 2012;176:1-9

[3] Seronello S, Sheikh M Y, Choi J. Redox regulation of hepatitis C in nonalcoholic and alcoholic liver. Free Radic. Biol. Med. 2007;43:869–882.

[4] Abdalla MY, Ahmad IM, Spitz DR, Schmidt WN, and Britigan BE. Hepatitis C virus-core and nonstructural proteins lead to different effects on cellular antioxidant defenses. J Med Virol 2005; 76: 489–497.

[5] Larrea E, Beloqui O, Munos-Navas MA, Civeira MP, Prieto J. Superoxidedismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. Free Radic Biol Med 1998; 24:1235-1241.

[6] von Herbay, A., et al. Vitamin E improves the aminotransferase status of patients suffering from viral hepatitis C: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Free. Radic. Res. 1997; 27:599–605.

[7] Mahmood, S., et al. Effect of vitamin E on serum aminotransferase and thioredoxin levels in patients with viral hepatitis C. Free. Radic. Res. 2003; 37: 781–785.

[8] Falasca, K., et al. Treatment with silybin–vitamin E–phospholipid complex in patients with hepatitis C infection. J. Med. Virol. 2008; 80:1900–1906.

[9] Houglum, K., et al. A pilot study of the effects of D-α-tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. Gastroenterology. 1997; 113:1069–1073.

[10] Melhem, A., et al. Treatment of chronic hepatitis C virus infection via antioxidants: results of a phase I clinical trial. J. Clin. Gastroenterol. 2005; 39:737–742.

[11] Morisco F, Vitaglione P, Carbone A, Stingo S, Scarpati S, Ascione A, Marmo R, Fogliano V, Caporaso N. Tomato-based functional food as interferon adjuvant in HCV eradication therapy. J Clin Gastroenterol. 2004;38(6):S118-120.

[12] P. Torricelli, P. Ferorelli, A. De Martino, F. Antonelli, A. Shevchenko, S. Beninati. Regression of Carotid Plaques in Individuals at Low-to-intermediate Cardiovascular Risk Treated with Citozym and Propulzym. European Journal of Preventive Medicine. 2014; 2 (3): 33-37.

[13] Saverymuttu SH, Joseph AE, Maxwell JD. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. Br Med J (Clin Res Ed).1986;292:13–15.

[14] Han TS, van Leer EM, Seidell JC, Lean ME. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: prevalence study in a random sample. BMJ. 1995;311:1401–1405.

[15] Clancy A, Crowley B, Niesters H, Herra C. The development of a qualitative real-time RT-PCR assay or the detection of hepatitis C virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008;27(12):1177-1182

[16] Butcher A, Aslam S, Hemyari P, Cowen U, Heilek G. HCV RNA detection in HCV antibody-positive patients with the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test, v2.0 in comparison with FDA-approved nucleic acid tests. J Clin Virol. 2014;60(4):336-340.

[17] Barbaro, G., et al. Serum ferritin and hepatic glutathione concentrations in chronic hepatitis C patients related to the hepatitis C virus genotype. J. Hepatol. 1999; 30:774–782.

[18] Kageyama, F., et al. Successful interferon therapy reverses enhanced hepatic iron accumulation and lipid peroxidation in chronic hepatitis C. Am. J. Gastroenterol. 2000; 95:1041–1050.

[19] Machida, K., et al. Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. 2004; J. Virol. 2004; 78:8835–8843.

[20] Barbaro, G., et al. Hepatic glutathione deficiency in chronic hepatitis C: quantitative evaluation in patients who are HIV positive and HIV negative and correlations with plasmatic and lymphocytic concentrations and with the activity of the liver disease. Am. J. Gastroenterol. 1996; 91:2569–2573.

[21] Gabbay, E., et al. Antioxidant therapy for chronic hepatitis C after failure of interferon α results of phase II randomized, double-blind placebo controlled clinical trial. World J. Gastroenterol. 2007; 13:5317–5323.

[22] Torricelli P., Ferorelli P., De Martino A., Antonelli F., Beninati S.. The Influence of Preventive Multiple Micronutrients Supplementation on Liver Steatosis in High-cholesterol Fed C57BL6/N Mice. American Journal of Life Sciences. 2013;1(2):55-60

[23] Morii K1, Shimomura H, Nakagawa H, Hasui T, Tsuji T. Anti-C100-3 antibody status, viral genomic sequences, and clinical features in chronic hepatitic patients with hepatitis C virus RNA in sera. Acta Med Okayama. 1992;46(4):285-293.



ICTUS

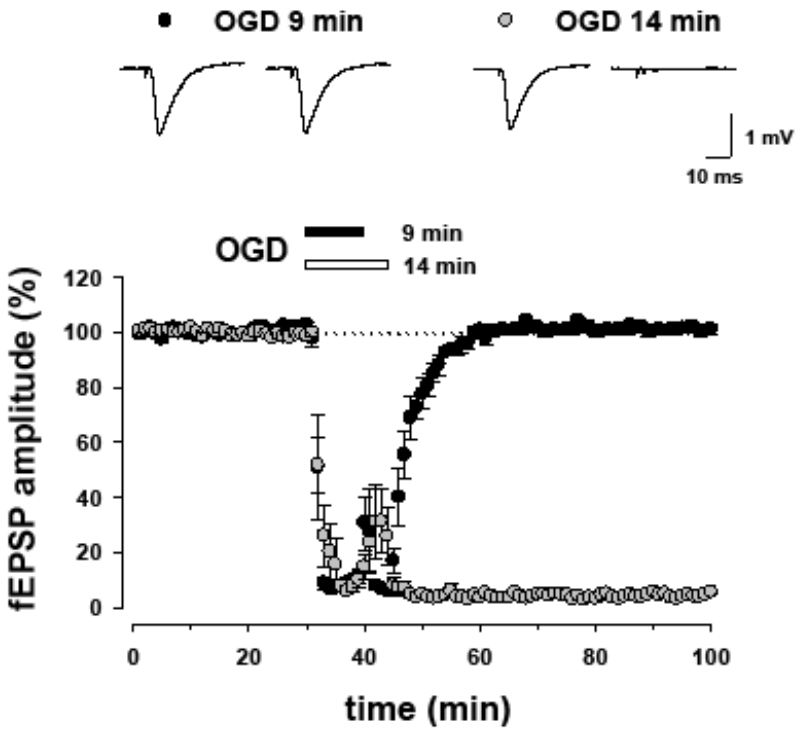
FONDAZIONE SANTA LUCIA
ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO
Sezione di Neuroscienze Sperimentali

DATI PRELIMINARI DI NEUROPROTEZIONE DI CITOZYM PRODOTTO DA CITOZEATEC

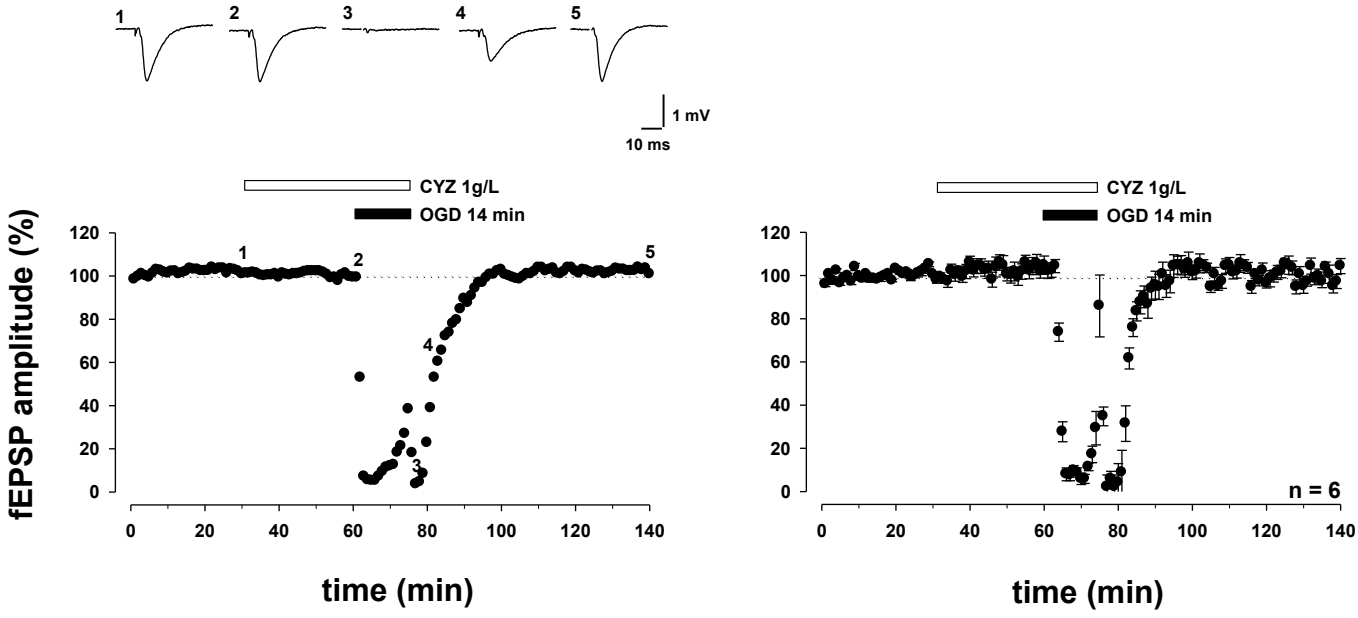
SPETT. AIAS

Il cervello Umano presenta il più alto consumo energetico dell'intero organismo a dispetto delle scarse capacità di riserva necessarie per il mantenimento dei gradienti ionici extra ed intracellulari e quindi del potenziale di membrana neuronale. È sufficiente che la deprivazione energetica superi pochi minuti per determinare danni neuronali irreversibili, e conseguenti gravi disabilità. È noto che il danno delle cellule nervose indotto da ischemia è un processo che avviene per tappe progressive e che interessa le diverse aree cerebrali in modo differenziato. Tra queste, l'ippocampo appare particolarmente suscettibile all'insulto ischemico, in quanto è possibile osservare fenomeni selettivi di degenerazione cellulare a livello dell'area ippocampale CA1. Evidenze sperimentali precedenti dimostrano come Citozym (CYZ) sia in grado di determinare su colture cellulari di fibroblasti un aumento dosedipendente dei livelli di SOD e CAT, con conseguente riduzione dei livelli di ROS. In tale contesto, abbiamo recentemente osservato come un potenziamento dell'attività della CAT si associ ad un effetto neuroprotettivo *(Armogida et al., Int J Immunopathol Pharmacol. 2011 Jul;24(3):735-747)*. Inoltre è stato visto come l'infusione del CYZ a varie dosi fosse in grado di indurre un aumento dei livelli di ossigeno ematico ed un aumentato smaltimento del lattato (Prof. Simone Beninati, dati non pubblicati).
Dunque, dal momento che CYZ sembra essere coinvolto nel metabolismo energetico mitocondriale è possibile che il trattamento acuto e/o cronico con CYZ possa modificare in modo significativo le risposte neuronali sottoposte a deprivazione energetica. In questo contesto, abbiamo recentemente dimostrato un potenziale ruolo neuroprotettivo del Citozym (CYZ) su fettine di ippocampo *in vitro*. Infatti, utilizzando un approccio elettrofisiologico, abbiamo visto come la perfusione di CYZ (1g/L) fosse in grado di revertire l'abbattimento della trasmissione sinaptica indotta dall'esposizione a periodi prolungati di ischemia. Da questi studi ci proponiamo di approfondire i meccanismi cellulari e molecolari alla base degli effetti neuroprotettivi di questo integratore. In particolare, verranno impiegate tecniche elettrofisiologiche, morfologiche e biochimiche al fine di chiarire se l'utilizzo del CYZ riduca sia il danno ipossico-ischemico che la sofferenza neuronale indotta da alterazioni del metabolismo mitocondriale. A tale scopo, utilizzeremo sia modelli sperimentali di ischemia in vitro che in vivo. La conoscenza dettagliata dei meccanismi che sono alla base dell'effetto neuroprotettivo del CYZ rappresenta un prerequisito fondamentale per poter proporre un suo impiego a scopo preventivo nei pazienti maggiormente a rischio di ischemia cerebrale.
In allegato pdf degli esperimenti preliminari.
Tali dati dimostrano un'efficacia neuroprotettiva di Citozym su fettine ippocampali di ratto sottoposte ad un insulto ischemico. Come si evidenzia, un'esposizione prolungata (14 min.) di ischemia, comporta una perdita irreversibile della trasmissione sinaptica glutamatergica.
Se invece pretrattano le fettine con Citozym, tale depressione sinaptica risulta essere solo transiente, conferendo dunque una importante neuroprotezione alle fettine ippocampali.
Questi dati preliminari sono la base di inizio per ulteriori approfondimenti ed aprono scenari interessanti su potenziali applicazioni nell'ambito delle malattie degenerative come nell'alzheimer, nell'ischemia cerebrale e cardiovascolare ed in special modo sulla loro prevenzione.

Effetti della deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD) sulla trasmissione sinaptica ippocampale



Effetto neuroprotettivo di Cytozim (1g/L) applicato in perfusione su fettine ippocampali



La sperimentazione preliminare è stata seguita dal Prof. Robert Nisticò e dal Prof. Nicola Mercuri, ricercatori dell'Istituto di ricovero e cura della Fondazione "Santa Lucia" di Roma.

Roma, 20/10/2011

Il Presidente AIAS
Dott. Francesco Antonelli

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
LABORATORIO DI ONCOLOGIA SPERIMENTALE E ISTOLOGIA

EFFETTI PROTETTIVI DI CITOZYM SULL'ICTUS INDOTTO SU ANIMALI C57BL/6N

Scopo della ricerca

L'ictus ischemico è una patologia cerebrovascolare distruttiva che in molti casi porta a morte. Al momento non sono utilizzabili agenti protettivi efficaci. Esperimenti preliminari effettuati su neuroni isolati hanno mostrato che Citozym, una miscela di antiossidanti commercializzata come integratore alimentare presenta un'azione neuro protettiva durante l'induzione del danno neuronale in ipossia (dati preliminari non pubblicati). Il fine della presente ricerca è stato quello di valutare l'effetto di tale integratore in su animali C57BL/6N per mezzo di un modello di ictus.

Metodo

I topi maschi C57BL/6N sono stati trattati con PBS i.v. come controllo e con Citozym i.v. a due concentrazioni (1:2 e 1:4 v.v.) 300 µl giornalmente per 14 giorni. Ai topi sia di controllo che trattati veniva occlusa per 2 ore l'arteria cerebrale mediana per mezzo di una metodica denominate MCAO (1). Gli stessi topi subivano dopo la rimozione dell'occlusione una riperfusione per 22 ore. I topi venivano sacrificati e immediatamente dopo si valutava il danno neurologico. Il cervello veniva prelevato al fine di valutare le dimensioni della zona infartuata e sezionato in fettine. Al fine di valutare il danno alla barriera emato-encefalica dovuto al MCAO, si adottava il colorante Evans blue (EB)(2).

Risultati

Il pretrattamento con Citozym alla concentrazione 1:2 ha ridotto significativamente il deficit neurologico conseguente al MCAO con una evidente riduzione della zona infartuata e del rigonfiamento degli emisferi. La estravasione di EB risultava ridotta nei topi trattati rispetto ai controlli dimostrando un ridotto danno alla EB.

Bibliografia

1. *Lo AC, Chen AY, Hung VK, Yaw LP, Fung MK, Ho MC, Tsang MC, Chung SS, Chung SK. Endothelin-1 overexpression leads to further water accumulation and brain edema after middle cerebral artery occlusion via aquaporin 4 expression in astrocytic end-feet. J Cereb Blood Flow Metab. 2005 Aug;25(8):998-1011.*
2. *Latour LL, Kang DW, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. Ann Neurol. 2004 Oct;56(4):468-77.*

RISULTATI

Distribuzione del danno neurologico

Dopo il MCAO I topi venivano osservati e classificati in base alle conseguenze del danno neurologico: Ogni segno viene valutato con un punteggio (***Tabella 1***):

0: nessun segno di danno neurologico (normale)
1: incapace di estendere le zampe anteriori (leggero)
2: girare attorno a se stessi (moderato)
3: perdita della capacità di camminare e dei riflessi dalla parte destra (grave)

Tabella 1

	Distribuzione del danno neurologico				
Score	0	1	2	3	Media±SEM
PBS CONTROLLO (n = 8)	0	2	4	2	2.00±0.27
CYT 1:4 (n = 7)	0	4	3	0	1.43±0.20
CYT 1:2 (n = 7)	0	6	1	0	1.14±0.14*

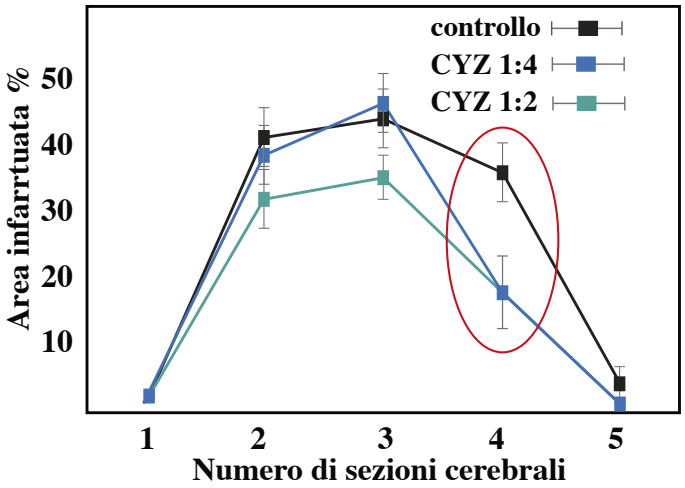
*P<0.05 CYT 1:2 vs. control, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test.

Il deficit neurologico appare meno severo nei topi trattati con Citozym (CYZ) 1:2 dopo MCAO.

Valutazione dell'area infartuata

Il cervello di ogni topo è stato sezionato in 5 fettine ed in ognuna è stato valutata la percentuale dell'area infartuata per mezzo di un analizzatore d'immagine computerizzato.
E' interessante notare come il trattamento con CYZ 1:4 mostra un effetto protettivo sulla sezione encefalica numero 4 simile a quello del trattamento con CYZ 1:2 (cerchio rosso).
Nelle sezioni precedenti CYZ 1:2 mostra una protezione maggiore rispetto a CYZ 1:4 (sezione 2 e 3). Si può concludere che l'effetto protettivo di CYZ 1:2 è omogeneo nelle varie aree cerebrali (***Figura 1***).

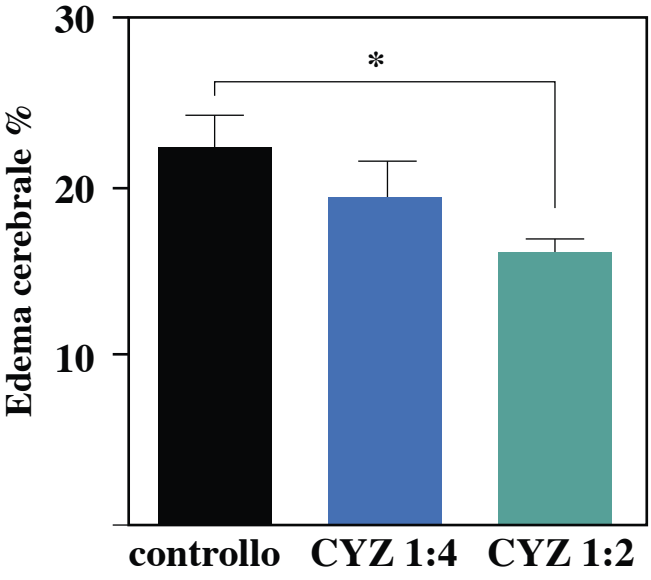
Figura 1



Valutazione dell'edema cerebrale

Similmente alla riduzione dell'area infartuata (***Figura 1***) è stato osservato un rigonfiamento edematoso ridotto nei topi trattati con CYZ 1:2 (ca. 15%) rispetto ai controlli (ca. 22%) (***Figura 2***). Una riduzione è anche stata osservata per il trattamento con CYZ 1:4 (ca. 20%). In ogni caso solo la riduzione con il CYZ 1:2 è stata considerata significativa (*).

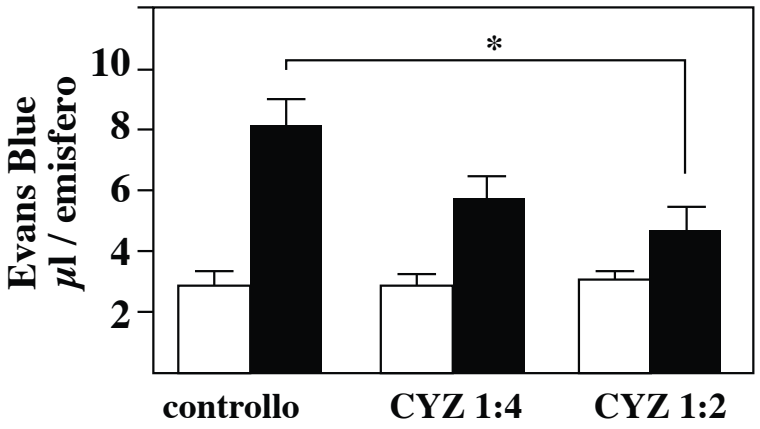
Figura 2



Valutazione del danno alla barriera emato-encefalica

Anche in questo caso (***Figura 3***) l'effetto sul danno della barriera emato-encefalica risulta ridotto dal trattamento con CYZ 1:2 rispetto al CYZ 1:4 comparati con il controllo. Il dato è stato ottenuto sulla base della diffusione del colorante Evans Blue secondo una metodica pubblicata[2].

Figura 3



Conclusioni

14 giorni di pretrattamento di topi C57BL/6N con Citozym i.v. (300 µl 1:2 v.v.) riducono significativamente il deficit neurologico, diminuiscono la zona infartuata e l'edema cerebrale così come proteggono la barriera emato-encefalica dalla distruzione, nel modello animale di ictus MCAO. Il presente studio suggerisce che la somministrazione di Citozym per via i.v. può essere usata come neuro protezione in pazienti ad alto rischio di ictus ischemico.

Roma, 01/08/2012

Prof. Simone Beninati



5

STENOSI CAROTIDEE

5.1 STENOSI CAROTIDEE - Ricerca Uniroma 2

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
LABORATORIO DI ONCOLOGIA SPERIMENTALE E ISTOLOGIA

PROGETTO CON RELAZIONE SCIENTIFICA DEL 06/12/2013
PROTOCOLLO DI TRATTAMENTO DI PAZIENTI CON STENOSI CAROTIDEA
DOPO 90 GIORNI DI TRATTAMENTO SECONDO IL PIANO TERAPEUTICO PREVISTO

Prodotti per la sperimentazione placche carotidee

PRIMI 2 GIORNI
1 cucchiaio da tavola di **Citozym** al mattino prima di colazione
1 cucchiaio da tavola di **Citozym** alla sera prima di coricarsi

DAL 3 AL 10 GIORNO
1 cucchiaio da tavola di **Citozym** al mattino prima di colazione
2 cucchiai da tavola di **Citozym** sciolti in un bicchiere di acqua alla sera dopo cena

DAL 11 AL 20 GIORNO
1 cucchiaio da tavola di **Citozym** al mattino prima di colazione
30 mL di **Citozym** con 1/2 stick di **Propulzym** sciolti in un bicchiere di acqua prima di cena

DAL 21 AL 90 GIORNO
1 cucchiaio da tavola di **Citozym** al mattino prima di colazione
20 mL di **Citozym** con 1/2 stick di **Propulzym** sciolti in un bicchiere di acqua prima di pranzo
30 mL di **Citozym** con 1 stick di **Propulzym** sciolti in un bicchiere di acqua prima di cena

Introduzione
La prima fase del progetto è stata quella di definire il grado di stenosi carotidea da considerare per lo studio.
A tal fine abbiamo considerato le le linee guida secondo la classificazione di Gray-Weale e Lusby.
Secondo queste linee l'analisi qualitativa della stenosi è definita dalle caratteristiche di ecogenicità ed ecostruttura della placca ateromasica. La valutazione quantitativa della stenosi carotidea è affidata all'analisi spettrale in PW (emissione pulsata).

Classificazione della placca carotidea:
1) placca ipoecogena omogenea
2) placca prevalentemente ipoecogena (ipoecogena per più del 50%)
3) placca prevalentemente iperecogena (iperecogena per più del 50%)
4) placca iperecogena omogenea
5) calcifica (fortemente iperecogena con cono d'ombra)

Valori flussimetrici per percentuali di stenosi

- **Stenosi di grado medio-basso** (**< 70%**) possono essere associate a valori flussimetrici nel range di normalità
- **Stenosi di grado elevato** (**> o = 70%**) secondo criteri **NASCET**, corrispondono a valori flussimetrici di PSV (PSV= peack systolic velocity) compresi tra **210 e 270 cm/sec** e valori di EDV (EDV= end diastolic velocity), compresi tra **70 e 110 cm/sec.**

Alterazioni indirette indicative di stenosi sono presenti sia a monte che a valle. A monte potremo notare un rallentamento del flusso con riduzione della componente diastolica, legata al freno circolatorio a valle. A valle della stenosi si potrà assistere ad un flusso a bassa differenza sisto-diastolica con aumento della turbolenza. Il picco sistolico a valle potrà essere abbassato e arrotondato con scarsa differenziazione sisto-diastolica (*pulsus tardus e parvus*).

- **Stenosi severe** (**> o = 90%**) sono difficilmente caratterizzabili all'esame US a causa della ristrettezza del lume residuo ed alla difficile collocazione del volume campione per la pulsatilità del vaso Al fine della valutazione dell'azione terapeutica del prodotto in esame le stenosi severe non sono state incluse nell'indagine.

Sperimentazione a 90 giorni di trattamento

Oggetto: *risultati dopo 90 giorni di trattamento per lo studio della riduzione della stenosi da placca carotidea.*

Premessa: la sperimentazione è stata effettuata seguendo le linee posologiche indicate (vedi allegato).

Risultati: 10 soggetti di età compresa fra i 50 e 70 anni con evidente diagnosi di placche carotidee e con percentuale di stenosi non inferiore al 40% e non superiore al 70%.
Sono riportati nella tabella che segue i risultati a 60 e a 90 giorni di trattamento. La sperimentazione sarà continuata per un totale di 120 giorni di trattamento.

Tabella 1

Paziente	Età	Stenosi iniziale %	media 1	Stenosi 60 gg trat %	media 2	% Rid
1. E.N.	65	40/50	45	35/40	37	18
2. T.S.	57	40/50	45	35/40	37	18
3. H.G.	66	60/60	60	55/60	57	5
4. T.D.	54	40/40	40	30/40	35	13
5. F.C	74	70/70	70	70/70	70	-
6. R.G.	68	50/50	50	45/50	47	6
7. R.V.	57	40/50	45	30/40	35	13
8. R.O.	66	50/60	55	40/40	40	27
9. P.F.	70	60/70	65	55/60	57	12
10. G.H.	65	50/55	52	50/50	50	-

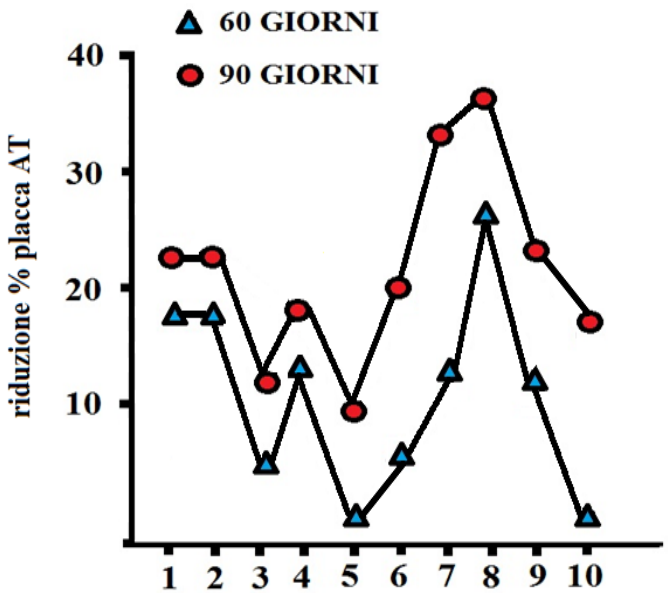
Tabella 2

				90 gg trat %		
1. E.N.	65	40/50	45	30/40	35	22
2. T.S.	57	40/50	45	30/40	35	22
3. H.G.	66	60/60	60	50/55	53	12
4. T.D.	54	40/40	40	30/35	33	18
5. F.C	74	70/70	70	60/65	63	10
6. R.G.	68	50/50	50	40/40	40	20
7. R.V.	57	40/50	45	30/30	30	33
8. R.O.	66	50/60	55	30/35	35	36
9. P.F.	70	60/70	65	50/50	50	23
10. G.H.	65	50/55	52	40/45	43	17

Discussione
Si evince dalla ***Tabella 1*** che il trattamento a 60 gg mostra una variabilità individuale piuttosto marcata, con intervallo di riduzione dal 5% al 27%. Due casi non hanno mostrato alcuna riduzione (pazienti n. 5 e 10). Considerando che la valutazione ecografica permette di poter valutare in maniera accurata la percentuale di stenosi carotidea, ma considerando l'alta variabilità della lettura, sono state elaborate le medie di due letture ecografiche (media 2) e queste comparate con il dato medio iniziale (media 1) per poter elaborare la % di riduzione della stenosi (% Rid). E' altrettanto evidente che in alcuni casi si è giunti ad una riduzione del 27 % (paziente n. 8) e del 18 % (pazienti n. 1 e 2). Il trattamento è stato effettuato in pazienti con pressione arteriosa alterata e livelli di colesterolemia superiori del 20/40% dai valori normali. L'assunzione di farmaci e la dieta sono state considerate durante la stesura dell'anamnesi di ogni soggetto sottoposto a trattamento.

Il trattamento è stato esteso a 90 giorni ed è risultato evidente un ulteriore miglioramento della riduzione della stenosi (***Tabella 2***). In particolare due pazienti di 57 e 66 anni (pazienti 7 e 8) hanno mostrato una riduzione del 33 e 36% rispettivamente. I pazienti 5 e 10 che nel ciclo di 60 giorni non hanno risposto al trattamento, a 90 giorni mostrano una riduzione del 10 e del 17%. Le variazioni percentuali dei due trattamenti a 60 e a 90 giorni sono mostrati nel grafico di ***Figura 1***, ponendo a 100 il dato iniziale.

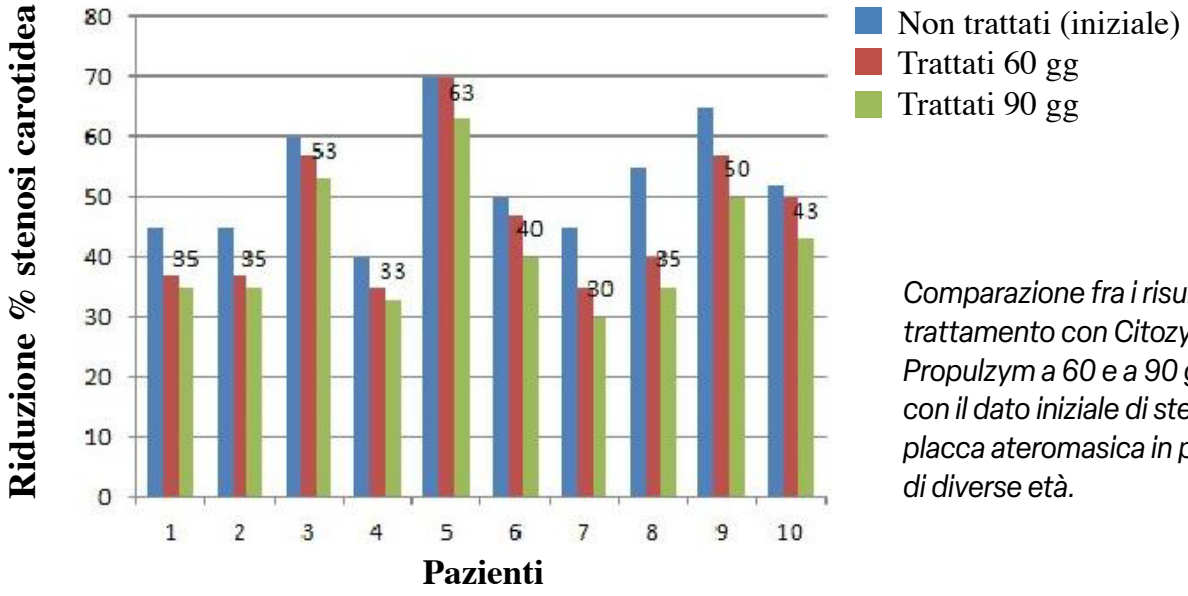
Figura 1



*Riduzione percentuale del grado di stenosi da placca carotidea in pazienti trattati per **60 giorni** (▲) e **90 giorni** (●) con protocollo terapeutico Citozym/Propulzym (vedi protocollo sperimentale).*

In ***Figura 2*** sono riportati gli istogrammi di distribuzione delle riduzioni comparate con il dato iniziale. E' ancora più evidente l'alta variabilità dei dati ottenuti. E' interessante evidenziare che alla riduzione della stenosi è seguita, in ogni caso, la riduzione della colesterolemia (dati in corso di elaborazione).

Figura 2



Comparazione fra i risultati del trattamento con Citozym e Propulzym a 60 e a 90 giorni, con il dato iniziale di stenosi da placca ateromasica in pazienti di diverse età.

Conclusioni

Il trattamento effettuato seguendo un protocollo che adotta due tipi di integratori alimentari (Citozym e Propulzym) secondo una precisa posologia di somministrazione (vedi protocollo allegato) ha condotto, dopo 60 giorni, ad una riduzione della stenosi carotidea da placca ateromasica, per un massimo del 27% in soggetti con stenosi iniziale fra il 40 e il 70%.
Tale riduzione è risultata correlata ai tempi di trattamento. Infatti a 90 giorni di trattamento i dati relativi alla percentuale di stenosi delle carotidi da placca ateromasica, sono stati ulteriormente ridotti con intervalli dal 23% (paziente di 70 anni con volume medio di stenosi iniziale elevato al 70% e colesterolemia superiore del 50% del dato normale) al 36% (paziente di 66 anni con stenosi media iniziale del 55% e colesterolemia superiore del 30% del valore normale).
Come previsto una piccola percentuale di pazienti ha risposto in maniera anomala al trattamento (riduzione assente a 60 giorni e del 10% a 90 giorni in paziente di 70 anni e colesterolemia superiore del 60% rispetto al valore normale).
Nel complesso i dai ottenuti suggeriscono che l'uso quotidiano dei due integratori citati può favorire e incrementare la circolazione ematica a livello cerebrale, migliorando di conseguenza le capacità cognitive del paziente e riducendo probabilmente il rischio di eventi vascolari cerebrali patologici.
Sono in corso di elaborazione i dati concernenti la colesterolemia.
Sembra preliminarmente evidente la riduzione di questo parametro ematico come conseguenza dell'assunzione dei due integratori alimentari citati.
E' indubbio comunque come l'azione dinamica di un integratore alimentare studiata con principi innovativi possa posizionarsi a livelli importanti principalmente come adiuvante nelle specifiche terapie se non addirittura come unico tentativo di cura in mancanza di un protocollo farmacologico adeguato, e come dimostrato in questo progetto sperimentale apre sicuramente nuove frontiere alle applicazioni sempre più attuali e sostenibili della nutraceutica.

Roma, 13/10/2013

Dott. Francesco Antonelli



Prof. Simone Beninati



European Journal of Preventive Medicine
2014; 2(3): 33-37
Published online July 20, 2014 (http://www.sciencepublishinggroup.com/j/ejpm)
doi: 10.11648/j.ejpm.20140203.12
ISSN: 2330-8222 (Print); ISSN: 2330-8230 (Online)

Regression of carotid plaques in individuals at low-to-intermediate cardiovascular risk treated with Citozym and Propulzym

Torricelli Piera[1], Ferorelli Pasquale[2], De Martino Angelo[2], Antonelli Francesco[2], Shevchenko Anna[3], Beninati Simone[2, *]

[1]Surgical Department, Hospital "A. Cardarelli", Campobasso, Italy
[2]Department of Biology, University of Rome, Tor Vergata, Roma, Italy
[3]Department of Science, People's Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Email address:
beninati@bio.uniroma2.it (B. Simone)

To cite this article:
Torricelli Piera, Ferorelli Pasquale, De Martino Angelo, Antonelli Francesco, Shevchenko Anna, Beninati Simone. Regression of Carotid Plaques in Individuals at Low-to-intermediate Cardiovascular Risk Treated with Citozym and Propulzym. *European Journal of Preventive Medicine.* Vol. 2, No. 3, 2014, pp. 33-37. doi: 10.11648/j.ejpm.20140203.12

Abstract: A prospective trial was performed to assess coronary plaque regression following about 5 months of treatments with two dietary supplements, Citozym and Propulzym. Coronary segments that included the most diseased plaque of 20 selected patients were analyzed using carotid ultrasound (CDUS). Inclusion criteria were as follows: 20 subjects (10 of control group and 10 of test group) aged between 54 and 74 years with a clear diagnosis of carotid plaque and stenosis percentage of not less than 40% and not more than 70%. The data obtained showed a wide inter-individual variability, with a range of reduction from 4% to 27%. It is interesting to note that the plaque reduction in one patient reached a value of about 27% observable with the ultrasonic examination. Since it is clear that carotid plaque morphology/stability is one of the most important factor regarding the definition of cardiovascular risk, our preliminary results suggest the possibility of a non-invasive treatment of carotid plaque.

Keywords: Dietary Supplements, Coronary Plaque, Carotid Ultrasound, Atherosclerosis

1. Introduction

The carotid artery runs in the neck and divides into the external carotid artery, which vascularizes the face, and in the internal carotid artery that carries blood to the brain. The bifurcation is the most common site of pathology, especially pathologic material accumulate as fat (lipids and cholesterol), calcium, cell debris, leading to the formation of plaques with the consequent progressive narrowing of the artery called stenosis. A stenosis at the level of the carotid arteries due to a deficient supply of blood to the brain. The most important risk of the presence of carotid plaques is the erosion of the surface of the plate with the fragmentation of particles that go to occlude terminal arteries of the brain, causing cerebral ischemia and stroke. The stroke can be massive and therefore lethal or marginal. Everything depends on the extent of the brain areas affected. The reversible stroke is called "transient ischemic attack" (TIA), regressing within a few hours. These events are usually an alarm bell, if not correctly interpreted and treated can lead to a permanent stroke called "cerebral vascular accident" (CVA). The symptoms that occur most frequently are: paralysis of an arm and/or leg, sudden loss of vision , inability to speak properly for a few minutes. The most common risk factors are: smoking, diabetes, hypertension, obesity, hypercholesterolemia, and age. Treatment may be surgery (endarterectomy) or medical (antiplatelet therapy). Randomized multicenter studies have shown that in asymptomatic patients surgical treatment is indicated when the stenosis reaches 70%, 50% in symptomatic patients. Before the operation is carried out a mapping Ecocolor Doppler of the carotid bifurcation that can significantly reduce the extent of the incision; thus obtaining an acceleration of healing time. Surgical treatment is performed under general anesthesia and involves complete removal of the carotid plaque. It has been shown that a percentage ranging from 20-50 % of the TIA is due to carotid disease.

Then through the execution of a color Doppler of the carotids, fast examination and non-invasive, it is perfectly possible to diagnose the presence of a carotid plaque, its morphology and the percentage of stenosis. If a person is part of a category and then a risk, it is important to run an Ecocolor Doppler every 12 months [1]. The active ingredient used in the longest antiplatelet therapy for the treatment of atherosclerosis has been acetylsalicylic acid. Aspirin exerts its antiplatelet effects by acetylating platelet cyclooxygenase, thus irreversibly inhibiting the formation of thromboxane in platelets [2]. Recently, folic acid, the vitamin B group, vitamin C and D, have been identified as appropriate supplements to reduce the negative effects of homocysteine , which facilitates the formation of thrombi in arteries and veins [3]. Free radical excess and oxidative stress are implicated in the formation and progression of atherosclerotic plaque through actions on susceptible vascular cells, such as by activating xanthine oxidase. Purine bases and other antioxidant compounds could play important protective roles in atherogenesis, as could non enzymatic low molecular weight thiol defenses, not previously evaluated in carotid artery plaque [4,5]. The formation of foam cells from monocyte-derived macrophages involves the uptake of modified lipoproteins by scavenger receptors. Antioxidants inhibit lipoprotein oxidation and may also modulate gene expression. The inhibitory effect of N-acetylcysteine (NAC) on atherosclerotic processes has been reported [6]. NAC express its antioxidant activity on the expression of the class A scavenger receptor (SR-A) types I and II in human macrophages. NAC leads to a decrease in SR-A mRNA and initially also to an attenuated uptake of modified lipoproteins [7]. Glutathione is an endogenous antioxidant and has an ubiquitous role in many of the body's defenses. Treatment with NAC has been shown to increase levels of glutathione. NAC has been proposed as an antiatherogenic agent [8].

Low-density lipoprotein (LDL) oxidation is a potential atherogenic agent, and protecting LDL from oxidation prevents atherogenesis. It has been shown that L-aspartate and L-glutamate decrease lipid peroxidation after reoxygenation by means of the initiation of the cardiopulmonary bypass circuit (CPB), when supplemented to the CPB prime, and so they may protect against atherogenesis [9]. Calcification at vascular sites is the most threatening localization and manifests as part of atherosclerosis or arteriosclerosis. Atherosclerosis is often accompanied by intimal plaque calcification, whereas arteriosclerosis is characterized by calcification of the media. The severity of calcification of cerebral or coronary atherosclerotic plaques is associated with an increased incidence of events such as stroke or myocardial infarction [10]. Furthermore, the effect of citric acid and certain carbonates of alkali metals on hypercholesterolemia and atherosclerosis has been studied with results that have been shown to reduce the formation of carotid plaques [11,12]. On the basis of this information, the aim of our project was to evaluate the action of two dietary supplements: Citozym (CYZ) rich in vitamins B, C and D, and Propulzym (PRZ), rich in NAC, glutamic acid, calcium carbonate and citric acid, on the carotid plaques, in individuals at low-to-intermediate cardiovascular risk.

2. Material and Methods

2.1. Subjects and Treatments

Members of this study were recruited from the ambulatory cardiac clinic and all the patients gave informed consent. Inclusion criteria were as follows: 20 subjects aged between 54 and 74 years with a clear diagnosis of carotid plaque and stenosis percentage of not less than 40% and not more than 70%, were examined for a period of about five months. Members of control group (n.10) were not treated while patients of the test group (n.10) were daily orally treated with CYZ and PRZ (Citozeatec S.r.l. Peschiera Borromeo, Milano, Italy). The extent of carotid plaques in control and test groups was assessed by means of carotid ultrasound Doppler Ecocolor (MC-DU-iVis30 CE/FDA), carried out once a month (Figure 1). During the trial, the hematological data of patients (cholesterol, HDL and LDL, blood glucose, blood urea nitrogen, creatinine and uric acid) were collected monthly (data not shown).

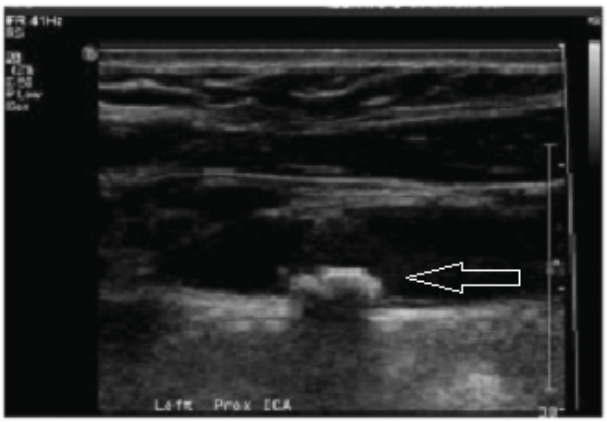


Figure 1. *Representative carotid artery ultrasonography of a patient showing the presence of a plaque with obstruction assessed at around 30%*

The treatment was carried out according to the following protocol: in the absence of contraindications to the two supplements they were administered in increasing doses during the planned 150 days of treatment. Therefore, 9 g of CYZ every morning during breakfast for all the period of treatments; 9 g of CYZ for two days at dinner, increased to 18 g for the next 7 days and then 40 g until the end of treatment; finally, 26 g of CYZ for lunch, from the 21st to the end of treatment. PRZ was administered in the dose of 6.5 g from the eleventh day of treatment until the twentieth, and then increased to 13 g from the twenty-first day until the end of the treatment to dinner, together with 6.5 g during lunch. An accurate observation of possible adverse effects on the patient was performed.

2.2. Statistical Analysis

All results are expressed as median values and interquartile range. Data analysis software system, (version 9.0) from StatSoft (2009, www.statsoft.com) was used for the statistical analysis. For analyses of independent groups the Student *t*-test (for variables with normal distribution) and Mann–Whitney's U test (for variables with non-parametric distribution) were carried out. For normal distribution, variables were analyzed by the Kolmogorov–Smirnov test with Lilliefors correction. Correlation between analyzed parameters was estimated by Pearson's test (for variables with normal distribution), and Spearman's test (for variables with non-parametric distribution). Variables describing clinical parameters (age, sex, present smoking, presence of diabetes mellitus, dyslipidemia and hypertension) were entered into a multivariate regression analysis to determine independent predictors of parameters describing the pathological status of patients.

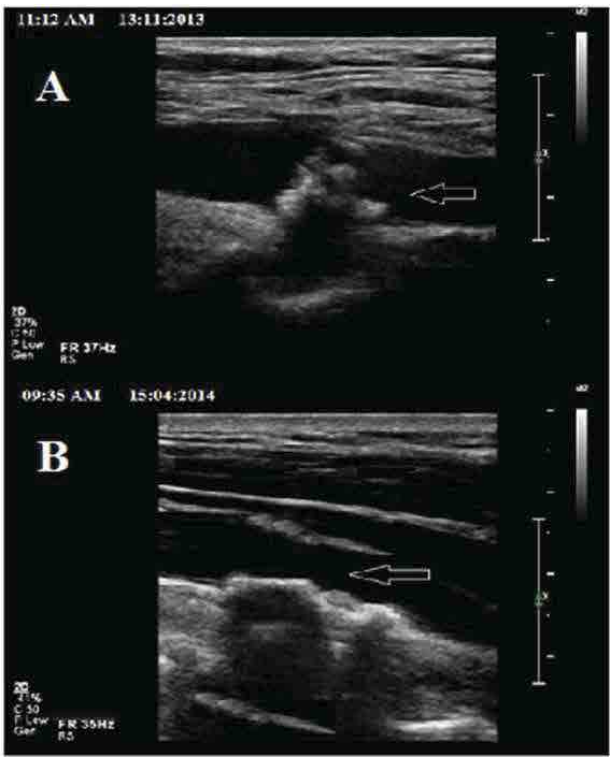


Figure 2. A*. Ultrasonography of the carotid artery of the patient n.8 (R.O.), showing the presence of a plaque with obstruction assessed at around 55%.* ***B****. plaque reduction of about 27% after 150 days of treatment with the combination of CYZ and PRZ (see Material and Methods).*

3. Results

Seven of the 10 plaques investigated were found to be free from symptoms, while the remaining three were found to be symptomatic following expert specialist stroke physician assessment. The mean age of the symptomatic patients was 70 years compared with 62 years for the asymptomatic None of the patient characteristics: sex (10 males), current or past tobacco smoking (60%), hypertension (60%), hypercholesterolemia (60%), diabetes mellitus (30%), ischemic heart disease (30%), family history of stroke (40%), alcohol consumption (40%) and peripheral vascular disease (10%), had a statistically significant relationship to the presence of symptoms ($p > 0.05$). In Table I is depicted the effect of the treatment of patients according to the protocol reported in Material and Methods. Data show a rather marked individual variability, with a range of reduction from 4% to 27% (% Red). Three cases showed a lower reduction (patients no. 3,5 and 10), this observation may suggest a potential sign of stabilization of plaques.

Table 1. *Percentages of reduction of carotid plaques in patients treated with CYZ and PRZ with the protocol described in Material and Methods. The initial values represent the average of two ultrasound assessments. Data reported in "% Final stenosis" were extrapolated from 5 ultrasound examinations and are the mean of five independent results. (% Red: percentage of reduction).*

Patient	Age	% Initial Stenosis	mean1	% Final Stenosis	mean2	%Red
1 E.N.	65	40/50	45	35/40	37	18
2 T.S.	57	40/50	45	35/40	37	18
3 H.G.	66	60/60	60	50/60	55	8
4 T.D.	54	40/40	40	30/35	33	18
5 F.C.	74	70/70	70	70/65	68	4
6 R.G.	68	50/50	50	45/45	45	10
7 R.V.	57	40/50	45	30/40	35	13
8 R.O.	66	50/60	55	40/40	40	27
9. P.F.	70	60/70	65	55/60	57	12
10 G.H.	65	50/55	52	45/50	48	9

It is also evident that in some cases it has come to a reduction of 27% (patient no. 8) with a clear change in the volume of the plaque (Figure 2). Furthermore, we also observed significant values of carotid plaque reduction of 18% (patient no. 1,2 and 4). Since ultrasound evaluation does not allow to assess accurately the percentage of carotid stenosis, we considered the means of two ultrasound readings (mean 2) at the end of treatment and compared these values with the initial data (mean 1) obtained prior the treatment. The treatment was performed in patients with abnormal blood pressure and cholesterol levels in excess of 20% from normal values. Taking medication and diet were considered during the drafting of the natural history of each subject.

4. Discussion

There are multiple research data that led to the recognition that atherosclerosis is a chronic inflammatory condition which is characterized by the formation of fibrotic leukocytes containing plaque [13,14]. The association between inflammation and oxidative stress is well documented with a number of studies of inflammatory conditions reporting elevated levels of 8-oxo-7, 8-dihydro-2′-deoxyguanosine (8-oxodG), one of the oxidative stress biomarker [15] . the inflammatory response can lead to the recruitment of activated leukocytes, which

may, in turn, give rise to a "respiratory burst" — an increased oxygen uptake that causes the release of high quantities of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide and hydrogen peroxide, with possible subsequent DNA damage production [16]. Proof of this proposal comes from the report of Dizdaroglu et al., who demonstrated that exposure to activated leukocytes caused DNA base modifications in human cells typical of those induced by hydroxyl radical attack [17]. Moreover, oxidatively damaged DNA has been found in atherosclerotic lesions and leukocytes of atherosclerotic patients [18,19,20]. Furthermore, there are data which provide evidence that oxidatively induced damage not only occurs in the DNA of atherosclerotic patients but also has some influence on long-term clinical outcome and a recent study demonstrated interesting evidence concerning direct/active involvement of oxidatively damaged DNA/failure of DNA repair in atherosclerosis, in an animal model [21,22]. It is believed that carotid plaque morphology/stability is one of the most important factors regarding the definition of cardiovascular risk [23,24]. However, there are conflicting data concerning factors which influence the plaque stability [25]. It is an important issue since it has become increasingly evident that the plaque morphology may be responsible for its rupture which in turn may give rise to an acute clinical outcome. It is also possible that plaque morphology may be shaped by oxidative stress [26]. Our experimental processing, carried out following a protocol that uses two types of dietary supplements (CYZ and PRZ) according to a precise dosage of administration (see Material and Methods) for 150 days, led to a clear reduction in carotid plaques in patients with an initial stenosis between 40% and 70%. These results suggest that daily use of the two supplements mentioned can probably increase the blood circulation in the brain, improving cognitive skills of the patient and possibly reducing the risk of cerebral vascular disease events. The wider distribution and the abundant presence of antioxidants in the CYZ and PRN formulation, together with the present results, may suggest that these mixture of antioxidants may have the potentiality of a possible contribute to the improvement of the quality of life of individuals affected of carotid atherosclerosis, at low-to-intermediate cardiovascular risk

Conflict of Interest

The authors have no potential conflicts of interest.

References

[1] Johnston SC, Rothwell PM, Nguyen-Huynh MN, et al, Validation and refinement of scores to predict very early stroke risk after transient ischaemic attack in Lancet, 2007;369, nº 9558, 283-292.

[2] Lewis, H. D.; Davis, J. W.; Archibald, D. G.; Steinke, W. E.; Smitherman, T. C.; Doherty Je, J. E.; Schnaper, H. W.; Lewinter, M. M.; Linares, E.; Pouget, J. M.; Sabharwal, S. C.; Chesler, E.; Demots, H. Protective Effects of Aspirin against Acute Myocardial Infarction and Death in Men with Unstable Angina". New England Journal of Medicine 1983;309 (7),396–403.

[3] Nygård, O; Vollset, SE; Refsum, H; Stensvold, I; Tverdal, A; Nordrehaug, JE; Ueland, M; Kvåle, G Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study.". JAMA : the journal of the American Medical Association 1995;274 (19): 1526–1533.

[4] Shin MH, Moon YJ, Seo JE, Lee Y, Kim KH, Chung JH Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. Free Radic Biol Med. 2008;44(4):635-645

[5] Ciari I., Terzuoli L., Porcelli B., Coppola M G, Marinello E. Antioxidant status and purine bases in carotid artery plaque. Nucleosides Nucleotides & amp Nucleic Acids. 2008; 27(6):624-627

[6] Meng XP, Yin CS, Cui JH, Li ZX, Wang L, Wang YW, Li YL. Inhibitory effect of N-acetylcysteine upon atherosclerotic processes in rabbit carotid. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2009; 89 (26):1850-3

[7] Svensson L, Norén K, Wiklund O, Lindmark H, Ohlsson B, Hultén LM Inhibitory effects of N-acetylcysteine on scavenger receptor class A expression in human macrophages. J Intern Med. 2002; 251(5):437-446

[8] Dodd S. Dean O. Copolov DL. Malhi GS. Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility in Expert Opinion on Biological Therapy, vol. 8, nº 12, 2008, pp. 1955–1962

[9] Yanni AE, Yatzidis HA, Kavantzas NG, Agapitos EV, Perrea DN, Karayannacos PE. Dietary L-aspartate and L-glutamate inhibit fatty streak initiation in cholesterol-fed rabbit. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2003;13(2):80-86

[10] Schlieper G, Westenfeld R, Brandenburg V, Ketteler M. Inhibitors of calcification in blood and urine. Semin Dial. 2007;20(2):113-121

[11] Kaĭdin DA. The effect of citric acid on experimental hypercholesteremia in atherosclerosis in rabbits. Biull Eksp Biol Med. 1968;65(3):36-39

[12] Kaĭdin DA, Grebennik LI. The effect of citric acid and alkali and alkaline earth metal carbonates on the development of experimental hypercholesteremia and atherosclerosis in rabbits. Kardiologiia. 1967;7(4):123-127.

[13] Libby P. Inflammation in atherosclerosis Nature, 2002; 420,868–874

[14] Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease N Engl J Med, 1999;40,115–126

[15] Wiseman H, Halliwel B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer Biochem J, 1996;313(1) 17–29

[16] Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? Clin Chim Acta, 2006; 365,30–49

[17] Dizdaroglu M, Olinski R, Doroshow JH, Akman SA Modification of DNA bases in chromatin of intact target human cells by activated human polymorphonuclear leukocytes Cancer Res, 1993;53,1269–1272

[18] De Flora S, Izzotti A, Walsh D, Degan P, Petrilli GL, Lewtas J Molecular epidemiology of atherosclerosis FASEB J, 1997;11,1021–1031

[19] Collins AR, Gedik CM, Olmedilla B, Southon S, Bellizzi M Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates FASEB J, 1998;12,1397–1400

[20] Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques Circulation, 2002;106,927–932

[21] Izzotti A, Piana A, Minniti G, Vercelli M, Perrone L, De Flora S Survival of atherosclerotic patients as related to oxidative stress and gene polymorphisms Mutat Res, 2007;621,119–128

[22] Mercer JR, Cheng KK, Figg N, Gorenne I, Mahmoudi M, J. Griffin J *et al.*DNA damage links mitochondrial dysfunction to atherosclerosis and the metabolic syndrome Circ Res, 2010;107,1021–1031

[23] Honda O, Sugiyama S, Kugiyama K, Fukushima H, S. Nakamura S, S Koide *et al.*Echolucent carotid plaques predict future coronary events in patients with coronary artery disease J Am Coll Cardiol, 2004;43,1177–1184

[24] Johnsen SH, Mathiesen EB, Joakimsen O, Stensland E, Wilsgaard T, Lochen ML *et al.*Carotid atherosclerosis is a stronger predictor of myocardial infarction in women than in men: a 6-year follow-up study of 6226 persons: the Tromso Study Stroke, 2007;38,2873–2880

[25] Hellings WE, Peeters W, Moll FL, Piers SR, Van Setten J, Van der Spek PJ *et al.* Composition of carotid atherosclerotic plaque is associated with cardiovascular outcome: a prognostic study Circulation, 2010;121,1941–1950

[26] Bitto A, De Caridi G, Polito F, Calo M, Irrera N, Altavilla D *et al.* Evidence for markers of hypoxia and apoptosis in explanted human carotid atherosclerotic plaques J Vasc Surg, 2010;52,1015–1021

6

STEATOSI EPATICA

6.1 STEATOSI EPATICA - Ricerca Uniroma 2

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
LABORATORIO DI BIOLOGIA CELLULARE E ONCOLOGIA SPERIMENTALE

La sperimentazione in vivo, su modello animale di steatosi, indotta metabolicamente e avente come fine la valutazione del potenziale effetto protettivo e/o curativo dell'integratore alimentare denominato CITOZYM commercializzato dalla ditta CITOZEATEC ha dato i seguenti risultati:

1. Gli animali del ceppo C57BL/6J nei quali è stata indotta "*steatosi epatica*" per 24 giorni, secondo un protocollo pubblicato (*Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. Int J Exp Pathol. 2006;87:116*) e contemporaneamente trattati con CITOZYM a due diverse concentrazioni (1:2 e 1:4) denominato "**trattamento preventivo**", hanno evidenziato la riduzione dell'epatomegalia, rispetto agli animali di controllo non trattati, del **39,31%** per la concentrazione **1:2** e del **12,19%** per la concentrazione **1:4**, con una corrispondente riduzione della massa lipidica epatica del **25,81%.** (conc. 1:2) e **12,90%** (conc. 1:4).
2. Gli animali del ceppo C57BL/6J nei quali è stata indotta "*steatosi epatica*" per 24 giorni secondo un protocollo pubblicato (*Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. Int J Exp Pathol. 2006;87:1-16*) e quindi trattati per altri 24 giorni con CITOZYM a due diverse concentrazioni (1:2 e 1:4) denominato "**trattamento curativo**", hanno evidenziato la riduzione dell'epatomegalia, rispetto agli animali di controllo non trattati, solamente per la concentrazione di CITOZYM 1:2 del **2,67%,** con una corrispondente riduzione della massa lipidica epatica del **4,30%**. Il trattamento con la concentrazione di CITOZYM 1:4 non mostrato alcun effetto riduttivo dei due parametri.

Sulla base dei risultati ottenuti, si può quindi concludere che l'integratore CITOZYM, presenta un potenziale effetto protettivo sul fegato sotto induzione di steatosi epatica e potrebbe essere consigliato il suo uso in condizioni a rischio di steatosi quali: obesità, uso smodato di alcool, diabete, alimentazione squilibrata, e in multiterapia farmacologica.

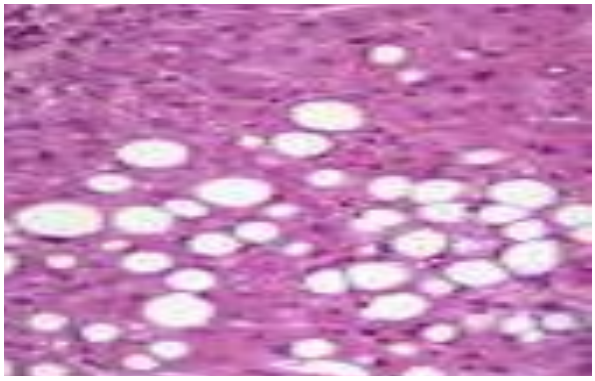
Dieta carente in metionina e colina

Questo tipo di dieta denominata MCD contiene il 40% di zucchero e il10% di grassi ed è priva completamente di metionina e colina (*Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. Int J Exp Pathol. 2006;87:1-16*). Questi due componenti sono essenziali per la b-ossidazione epatica e per la produzione delle VLDL. Inoltre la mancanza di colina interferisce sulla secrezione epatica di VLDL. Il risultato di questa malfunzione porta alla deposizione di lipidi nel fegato ed ad epatomegalia. Il danno epatico in queste condizioni viene esacerbato da un incrementato stress ossidativo e da mutamenti nelle citochime e adipocitochine. È stato dimostrato che la riduzione dello stress ossidativo incrementando la capacità antiossidante riduce il grado di steatoepatite mettendo in evidenza l'importanza delle specie reattive dell'ossigeno in questo modello (*Oz HS, Im HJ, Chen TS, de Villiers WJ, McClain CJ. Glutathioneenhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. J Biochem Mol Toxicol. 2006;20:39-47*). I risultati ottenuti dalla sperimentazione possono derivare dalle ben note proprietà antiossidanti dI CITOZYM.

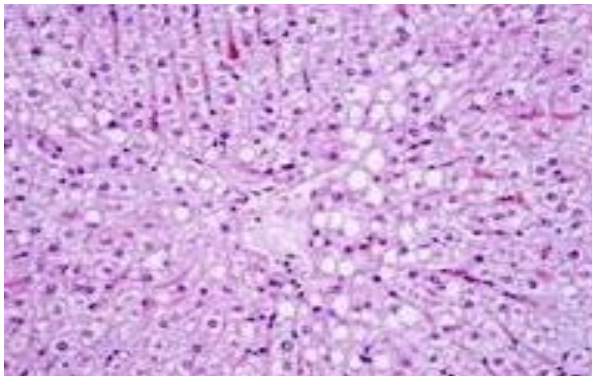
Roma, 04/07/2012, Univesità Roma "Tor Vergata"

Dott. Francesco Antonelli,
Collaboratore di ricerca

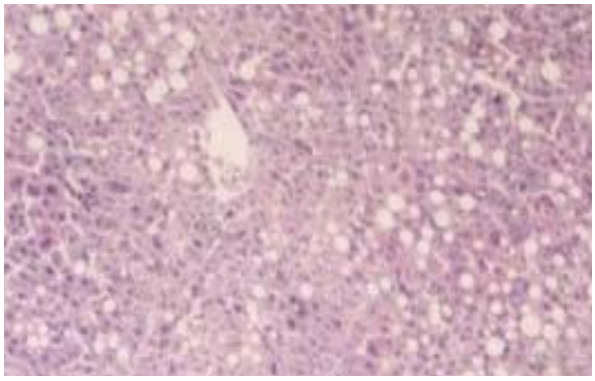
Prof. Simone Beninati
Dipartimento di Biologia



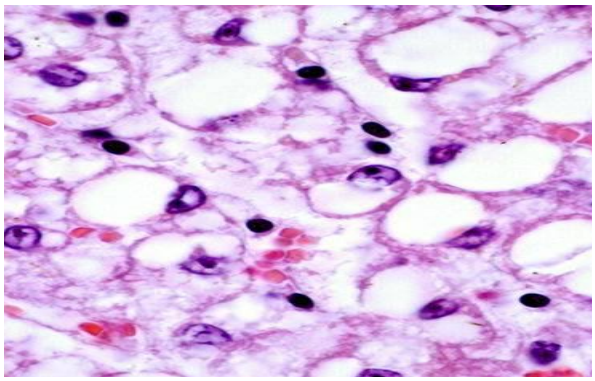
Steatosi indotta da trattamento con EX 1:4



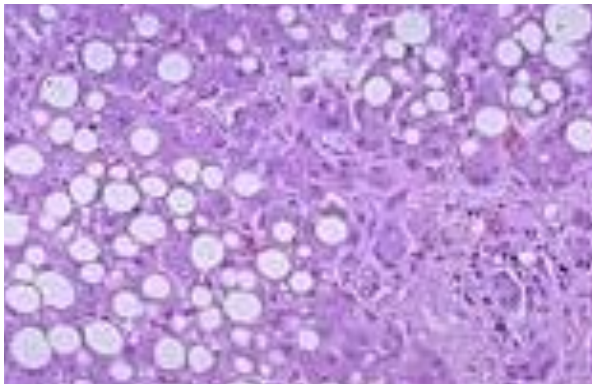
Sezione di fegato trattato contemporaneamente con EX e con CYZ 1:2.
Si nota una significativa diminuzione delle gocce lipidiche.



Sezione di fegato trattato contemporaneamente con EX e con CYZ 1:4.
Si notano piccole e abbondanti delle gocce lipidiche.



Sezione di fegato trattato con EX e successivamente con CYZ 1:4.
Si notano grandi gocce lipidiche.



Sezione di fegato trattato con EX e successivamente con CYZ 1:2.
Si nota una lieve riduzione delle gocce lipidiche.

American Journal of Life Sciences
2013; 1(2): 55-60
Published online May 30, 2013 (http://www.sciencepublishinggroup.com/j/ajls)
doi: 10.11648/j.ajls.20130102.16

The influence of preventive multiple micronutrients supplementation on liver steatosis in high-cholesterol fed C57BL6/N mice

Torricelli P.[1, *], Ferorelli P.[1], De Martino A.[2], Antonelli F.[2], Beninati S.[2]

[1]Department SPES, University of Molise, Campobasso, Italy
[2]University of Rome, Tor Vergata, Dept Biology, Roma, Italy

Email address:
beninati@bio.uniroma2.it(Beninati S.)

To cite this article:
Torricelli P., Ferorelli P., De Martino A., Antonelli F., Beninati S.. The Influence of Preventive Multiple Micronutrients Supplementation on Liver Steatosis in High-cholesterol Fed C57BL6/N Mice. *American Journal of Life Sciences.* Vol. 1, No. 2, 2013, pp. 55-60
doi: 10.11648/j.ajls.20130102.16

Abstract: Liver steatosis development was obtained after high cholesterol diet (HCD) in C57BL6/N mice. Mice were preliminarily treated for 10 days with multiple micronutrients contained in a commercial food supplement called Citozym (CIZ), and successively for 40 days with CIZ and HCD, to compare the protection effect of used compounds on liver metabolism and metabolic steatosis. At the end of the experiments, livers were dissected for histological examinations. Plasma total cholesterol (TCH), triacylglycerol (TAG) aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) concentrations were significantly higher in all HCD-fed mice. These data support a lipotoxic model of cholesterol-mediated hepatic steatosis. We found that the administration of CIZ to HCD-mouse model of steatosis significantly decreased plasma TCH, TAG, ALT and AST levels along with a reduction of the accumulated fat and inflammation in the liver. These findings suggest that a preventive and continuative treatment of CIZ exerts a protective effect against metabolic hepatosteatosis.

Keywords: Micronutrients, Antioxidants, Cholesterol, NAFLD, Metabolic Steatosis

1. Introduction

The typical diet in modern industrialized societies is high-fat content. Chronic consumption of this type of diet is considered a major cause of a variety of health problems including obesity, diabetes and cardiovascular diseases [1]. It is well known that liver is the main organ for lipid metabolism and its lipid content and composition depend on the diet. In fact, feeding with high-fat diet for long periods of time can have adverse effects on liver and onset of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) which is one of the leading causes of hepatic dysfunction in the modern world and includes a broad spectrum ranging from benign hepatic steatosis to cirrhosis [2]. Regardless of etiology of NAFLD, lipid accumulation and oxidative stress are two requisites for this disease progression [3]. Increased fat in the liver, as a consequence of increased synthesis and decreased oxidation of fat by hepatic parenchymal cells, perturbs the metabolism of the liver, while administration of a diet rich of antioxidants may have a positive influence upon the same process [4]. Fundamental importance for the activities of cell membranes is their fluidity, which depends upon the levels of cholesterol and the length of residue chains of unsaturated fatty acids contained in phospholipids. A diet rich in cholesterol may cause disturbance of function of cell membranes with an increased or decreased activity of liver enzymes. [5]. While simple steatosis is accepted as a benign state, steatohepatitis, because of elevated liver enzymes [alanine aminotransferase (ALT: EC 2.6.1.8) and aspartate aminotransferase (AST: EC 2.6.1.1)] and certain metabolic abnormalities such as diabetes, obesity, dyslipidemia, hypertension and insulin resistance is assessed as a serious condition [6]. Therefore, we considered as markers of steatosis these two enzymes related to hepatic metabolism, which are increased in the blood in the case of damage to hepatic cells. Recently, there has been an increased interest in the recognition of natural or alternative medications in the prevention of many diseases. Despite this growing

popularity, there is limited evidence for the effectiveness of many of these natural treatments such as antioxidants.

Antioxidants are believed to protect body cells from damage caused by by-products of oxidation, known as oxygen free radicals, which may suppress immune function [7]. These antioxidants are abundant in CIZ and have been reported to possess various health benefits [8]. The present study was undertaken to investigate whether oral dosing with a commercial mixture of antioxidants called Citozym (CIZ) rich in vitamins B5, B9, C and D, influences enzymatic activity and the metabolism of the liver in HCD-fed C57BL6/N mice

2. Materials and Methods

Male C57BL6/N mice were purchased from IFFA Credo (L'Abreole, France). Mice were housed throughout the experiments in air-conditioned animal room and fed with a AIN-76 purified rodent diet composition (Dyets, Inc. Bethlehem, PA USA). Ten mice were used for each experimental group. Treated mice were fed ad libitum with food containing cholesterol (2 mg/g b.w./24 h). The commercial mixture of antioxidants (CIZ) was a gift from Citozeatec (Citozeatec S.r.l. Peschiera Borromeo, Milano, Italy). Cholesterol was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). ALT, AST, TCH and LDH were determined by kinetic methods, using kits by Alpha-Diagnostic (Germany).

2.1. Experimental Protocol

Male C57BL6/N mice (n=40) of 13 weeks of age and a body weight of about 25/35 g were divided in four groups of 10 animals each. Group A: animals on regular, standard diet as control. Group B: animals staying on a HCD for 40 days (50/70 mg/24 h). Group C: animals were treated by oral administration of 15 mL/day of CIZ, diluted 1:2 v/v with physiological solution (PS) for 60 days and subjected to HCD from day 11 to day 40. Group D: animals were treated by oral administration of 15 mL/day of CIZ , diluted 1:4 v/v with PS for 60 days and subjected to HCD from day 11 to day 40. These doses were selected from previous dose–response studies [9]. Briefly, treatments with CIZ were started 10 days prior to the treatment with HCD and continued for the following 40 days. 24 hours after the last treatment with CIZ plus HCD, C57BL6/N mice were sacrificed under anesthesia, with pentobarbital 60 mg/kg and their livers were dissected for histological examination. Plasma for biochemical analysis was collected every 4 days during the treatments and stored at −75°C until analyzed. To obtain the blood plasma, EDTA was used as anticoagulant.

2.2. Liver Histology

Liver sections were formalin fixed and paraffin embedded prior to sectioning. All sections were then stained with hematoxylin and eosin (Sigma), encoded, and assessed for steatosis and inflammation.

2.3. Statistical Analyses

The statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test for intergroup comparisons. Spearman's rank correlation test and the linear regression analysis were performed to analyze correlations between groups B/C and B/D and the duration of administration of CIZ and to draw least squares regression lines. Values were expressed as the mean ± SD. $p<0.05$ was regarded as statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of CIZ on HCD-induced Steatosis in C57BL6/N Mice

As shown in Figure 1, the TCH of C57BL6/N mice of the four groups of treatment taken at the end of the study were statistically different. The TCH of mice of the control (group A) was found about 6.64 ± 2.19 mmol/L, during the time of experiments. TCH of mice under HCD (group B), increased during the time and reached in about 40 days of treatment a value of 40.00 ± 6.14 mmol/L and in 60 days 68,53± 7.40 mmol/L. The TCH of the groups C and D was significantly lower than that of the group B ($p<0.05$). Data collected for these groups at 40 and 60 days of treatments were 20.20 ± 5.43 mmol/L and 28.62 ± 4.32 mmol/L for group C and 30.23 ± 4.32 mmol/L and 57.42 ± 4.32 mmol/L for group D, respectively.

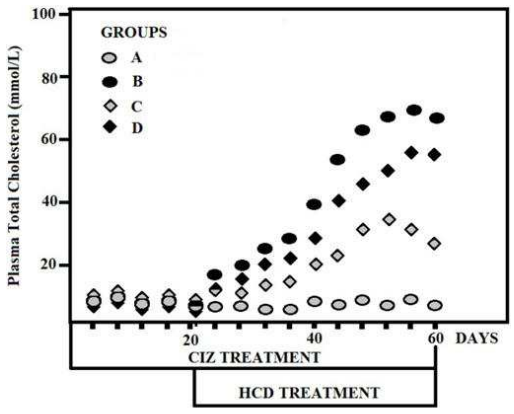


Figure 1. *Plasma levels of TCH in HCD-fed and CIZ-treated C57BL6/N mice. Data are the mean of three determinations. ±SD is cited into the text.*

Plasma TAG levels were significantly increased upon HCD treatment compared to the control group A (0.62 ± 0.12 mmol/L) (Figure 2). Indeed, the amount of plasma TAG was found at 40 and 60 days of treatments of 4.10 ± 1.35 mmol/L and 6.63 ± 2.25 mmol/L, respectively. TAG of mice under HCD and CIZ treatments, decreased during the time and was at 40 days of 1.70 ± 0.54 mmol/L and at 60 days of 1.25 ± 0.30 mmol/L for group C. The effect of CIZ for group D still showed a significative reduction of activity (($p<0.05$). Indeed, the TAG levels were found of

2.80 ± 1.32 mmol/L at 40 days and 2.63±1.84 mmol/L at 60 days of treatments.

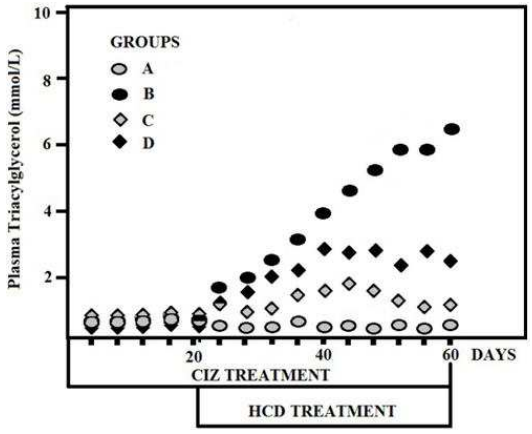


***Figure 2**. Plasma levels of TAG in HCD-fed and CIZ-treated C57BL6/N mice. Data are the mean of three determinations. ±SD is cited into the text.*

Figure 3 shows the levels of plasma ALT express as IU/L in control cells (4.52± 2.24 IU/L) and during the treatment with HCD and CIZ. HDC treatments increased the levels of ALT with a peak at 44 days of 15.00 ± 3.75 IU/L. The concentration suddenly decreased in 26 days to 11.53± 3.32 IU/L. Plasma concentration of ALT in mice under HCD and CIZ treatments, decreased during the time and was found at 40 days of 8.77 ± 1.54 IU/L and at 60 days of 4.22 ± 0.60 IU/L for group C. The amount of plasma ALT for group D was found at 40 and 60 days of treatments of 11.70 ± 2.35 IU/L and 8.43 ± 2.25 IU/L, respectively.

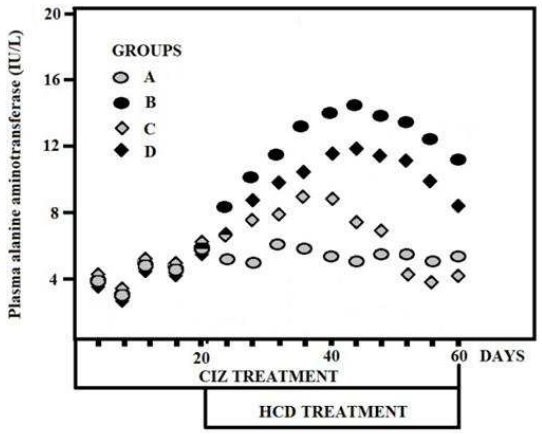


***Figure 3.** Plasma levels of ALT in HCD-fed and CIZ-treated C57BL6/N mice. Data are the mean of three determinations. ±SD is cited into the text.*

Figure 4 shows the levels of plasma AST express as IU/L in control cells (3.22± 1.44 IU/L) and during the treatment with HCD and CIZ. HDC treatments increased the levels of AST with a peak at 40 days of about 12.70 ± 2.65 IU/L that slightly decreased in 10 days to a value of 11.21± 2.21 IU/L. The mice under treatment with HCD and CIZ, showed a reduction of AST at 40 and 60 days for both groups C and D. The activity of CIZ for group C was more effective in AST plasma levels reduction (6.23± 1.63 at 40 days; 5.12± 2.12 at 60 days) than in group D (10.50± 2.31 at 40 days; 8.2± 1.77 at 60 days).

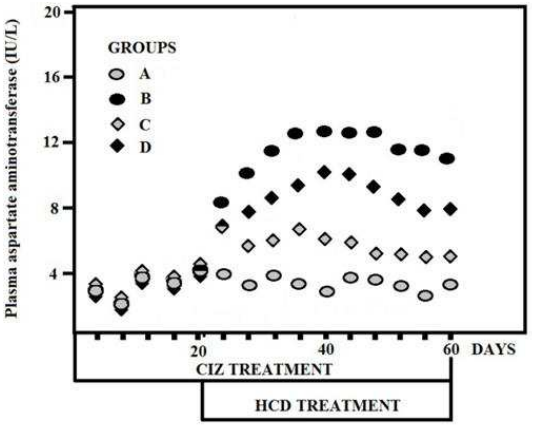


***Figure 4**. Plasma levels of AST in HCD-fed and CIZ-treated C57BL6/N mice. Data are the mean of three determinations. ±SD is cited into the text.*

3.2. Effects of Treatments with CIZ on Liver of HCD-fed C57BL6/N Mice

The Histological sections of normal liver tissue are shown in Figure 5a. HCD-fed mice showed predominantly large lipid-filled vacuoles (Figure 5b). Liver sections from HCD and 1:2 CIZ-fed mice revealed a reduction of lipid accumulation in the form of lipid droplets, or even small lipid droplets (Figure 5c). Evaluation of hepatic inflammation with hematoxylin and eosin liver staining, revealed significant differences between HCD and HCD and CIZ-fed mice (data not shown). Indeed CIZ treatment led to a reduction of the accumulated fat and of inflammation in the liver. These observations indicate the preventive effects of CIZ on HCD-induced steatosis.

4. Discussion

Oxidative stress is considered to play a central role in the pathogenesis of NAFLD because the increased production of ROS is known to cause lipid peroxidation, followed by activation of the inflammatory response, and of stellate cells, leading to fibrogenesis [10–11]. Lipid peroxidation usually leads to the formation of peroxyl radicals, which are the central species of the peroxidation chain reaction.

In Japan, acute encephalopathy with hepatic steatosis resembling Reye's syndrome has been reported to occur after treatment with the pantothenic acid (Vitamin B5) antagonist, calcium hopantenate [12]. Pantethine is a dimeric form of pantothenic acid, composed of two molecules of pantothenic acid linked by cysteamine bridging groups. Pantethine treatment produced significant reduction of the better known risk factors (total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, and apo-B) and a significant increase of HDL-cholesterol (signally HDL2) and apolipoprotein A-I [13-14]. Vitamin B9 (Folic acid)

supplementation reduces visceral obesity and improves plasma adiponectin levels [15]. Vitamin C (Ascorbic acid) reduced oxidative stress and markedly inhibited the development of experimental liver steatosis induced by choline-deficient diet [16]. Yin et al recently reported that the preventing effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 against high fat diet-induced hepatic steatosis in rats is related to the inhibition of lipogenesis and the promotion of fatty acids oxidation in rat liver [17]. In addition to the mentioned components, CIZ have many other micronutrients such as polyalcohols (mannitol and sorbitol), enzymes (amylase and lattase), inositol, and several sugars (maltose, maltotriose and maltitol). It is interesting to note that inositol, was previously shown to prevent fatty liver in rats [18]. All these beneficial effects of these micronutrients might play important roles in preventing the initiation and development of fatty livers. However, most of these micronutrients are removed in traditional food processing technology currently used in the world (extraction and refining), which will have an adverse effect on the hepato-protective effect.

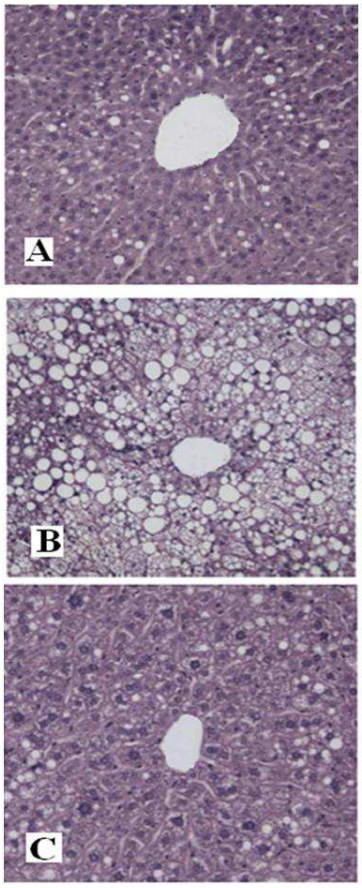


Figure 5. *Histological sections of liver tissue from control, x 150 (A), HCD-fed, x100(B) and HCD-1:2CIZ, x200 (C) C57BL6/N mice.*

A significative decreased plasma ALT and AST activities, as well as plasma TCH levels, in comparison with the HCD-mice, who presented clear sign of metabolic steatosis, was observed. In the present study, solutions of CIZ supplemented to the HCD mice for 60 days resulted in a dose dependent reduction of HCD-induced steatosis. Several studies have demonstrated that hepatocytes that internalize exogenous cholesterol repress its endogenous biosynthesis in response to HCD (19). Another important protective mechanism against hepatic cholesterol accumulation is cellular efflux of this steroid and bile acid biosynthesis [20, 1]. This may explain the observed increased of plasma TCH in our HCD-fed mice. Furthermore, as expected, plasma activities of ALT and AST, were both substantially elevated by the HCD treatment. CIZ-treatment resulted in significant reductions in these plasma enzymatic activities in a dose dependent mechanism. The protective action of CIZ against hepatic steatosis involved not only ALT and AST activities, but also a decreased concentration of TAG. A recent study showed that the increased cholesterol ester in lipid droplets could limit the hydrolysis of triglycerides and decrease hepatic triglyceride secretion out of cells, leading to hepatic steatosis in the liver of HCD-fed mice [22]. The protective action of CIZ against HCD-induced hepatic steatosis in mice appears to be likely mediated through the antioxidative property of some key micronutrients involved in regulation of lipogenesis. In conclusion obtained results showed a preventive and beneficial influence of CIZ supplementation on liver steatosis development.

Conflict of Interest

The authors have no potential conflicts of interest

References

[1] Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH & Brand-Miller J**.** Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. Am J Clin Nutr. 2005; 81(2)**:**341-354.

[2] Farrell GC & Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology. 2006; 43(2 Suppl 1)**:**S99-S112.

[3] Day CP & James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology. 1998; 114(4)**:**842-845

[4] Kartal Ozer N, Negis Y & Aytan N. Molecular mechanism of cholesterol or homocysteine effect in the development of atherosclerosis: role of vitamin E. Biofactors. 2003;19:63–70

[5] Unger RH. Lipotoxic diseases. Annu Rev Med. 2002; 53:319–336

[6] Friis-Liby I, Aldenborg F, Jerlstad P, Rundström K & Björnsson E. High prevalence of metabolic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Scand J. Gastroenterol 2004; 39: 864-869

[7] Mukhopadhyay-Sardar S, Rana MP & Chatterjee M. Antioxidant associated chemoprevention by

selenomethionine in murine tumor model. Mol Cell Biochem. 2000; 206(1–2):17–25

[8] Antonelli F & Beninati S. Enhanced survival of B16-F10 melanoma tumour-bearing C57BL6/N mice treated with a mixture of antioxidants in: Recent Res Devel in Life Sci. 2011;5:51-60 Research Signpost, Trivandrum India.

[9] Torricelli P, Ferorelli P, De Martino A, Antonelli F &Beninati S. Preventive Effects of A Mixture of Micronutrients with Antioxidative Properties on Experimentally Induced Prostate Hyperplasia. American J Life Sci. 2013; 1(1): 22-26.

[10] Yang SQ, Zhu H, Li Y, Gabrielson K, Trush MA & Diehl AM: Mitochondrial Adaptations to Obesity-Related Oxidant Stress. Arch Biochem Biophys. 2000; 378(2):259-268.

[11] Curzio M, Esterbauer H & Dianzani MU: Chemotacticactivity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. Int J Tiss Reac 1985; 7:137-142.

[12] Noda S, Haratake J, Sasaki A, Ishii N, Umezaki H & Horie A. Acute encephalopathy with hepatic steatosis induced by pantothenic acid antagonist, calcium hopantenate, in dogs. Liver. 1991;11(3):134-142.

[13] Bertolini S, Donati C, Elicio N, Daga A, Cuzzolaro S, Marcenaro A, Saturnino M & Balestreri R. Lipoprotein changes induced by pantethine in hyperlipoproteinemic patients: adults and children. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol. 1986; 24(11):630-637.

[14] Osono Y, Hirose N, Nakajima K & Hata Y. The effects of pantethine on fatty liver and fat distribution. J Atheroscler Thromb. 2000; 7(1): 55-58.

[15] Buettner R, Bettermann I, Hechtl C, Gäbele E, Hellerbrand C, Schölmerich J & Bollheimer LC. Dietary Folic Acid Activates AMPK and Improves Insulin Resistance and Hepatic Inflammation in Dietary Rodent Models of the Metabolic Syndrome. Horm Metab Res. 2010; 42(11): 769-774.

[16] Oliveira CP, da Costa Gayotto LC, Tatai C, Della Bina BI, Janiszewski M, Lima ES, Abdalla DS, Lopasso FP, Laurindo FR & Laudanna AA. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet. J Cell Mol Med. 2002; 6(3):399-406.

[17] Yin Y, Yu Z, Xia M, Luo X, Lu X & Ling W. Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. Eur J Clin Invest. 2012; 42(11):1189-1196.

[18] Okazaki Y & Katayama T. Effects of dietary carbohydrate and myoinositol on metabolic changes in rats fed 1, 1, 1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane (DDT). J Nutr Biochem. 2003; 14: 81-9.

[19] Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. J Clin Invest. 2002; 110(7):905-911.

[20] Tall AR, Costet P & Wang N. Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. J Clin Invest. 2002; 110 (7):899–904.

[21] Bjorkhem I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis?. J Clin Invest. vol. 2002; 110 (6):725–730.

[22] Alger HM, Brown JM, Sawyer JK, Kelley KL, Shah R, Wilson MD, Willingham MC & Rudel LL. Inhibition of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) prevents dietary cholesterol-associated steatosis by enhancing hepatic triglyceride mobilization. J Biol Chem. 2010; 285(19):14267-14274.

7

CARCINOMA PROSTATICO

7.1 CARCINOMA PROSTATICO - Ricerca Uniroma 2

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
LABORATORIO DI ONCOLOGIA SPERIMENTALE E ISTOLOGIA

CARCINOMA DELLA PROSTATA

Sommario

Parecchi studi indicano che alto stress ossidativo è associato con varie malattie degenerative, tra cui i tumori. Gli alti livelli dei radicali liberi presenti in molti pazienti derivano dalla mancanza cronica di antiossidanti, causata da una dieta sempre più povera e artificiale. Lo studio presentato in questa ricerca, condotta su 50 vo- lontari maschi, portatori di Carcinoma prostatico (PCa) nelle diverse fasi di sviluppo e nell'ambito della tera- pia attuale, ha dimostrato che l'assunzione giornaliera di antiossidanti contenuti in due integratori alimentari, Citozym e Propulzym, induce una significativa riduzione del PSA e anche di diversi parametri clinici correlati con PCa. Questo risultato suggerisce un potenziale rallentamento della progressione della malattia.
Questo studio è stato progettato sulla base di una recente prova preliminare che ha evidenziato l'attività positiva di Citozym in un modello dell'ipertrofia prostatica benigna. Gli studi sono in corso per identificare i componenti presenti in questi integratori alimentari che colpiscono di segnali biochimici. Ciò non significa che l'assunzione di antiossidanti è una cura per la PCa, ma che lo stress ossidativo non diagnosticato, molto meno corretto dagli approcci oncologici standard, contribuisce all'evoluzione della malattia tumorale. In altre parole, l'onco- logia attuale si concentra correttamente sulla riduzione della massa del tumore, ma non interviene sul mezzo biologico che l'ha prodotta. Ecco perché c'è ancora una drammatica incidenza di recidive.

1. Introduzione

PCa è riconosciuto come uno dei principali problemi medici della popolazione maschile. In Europa, è di gran lunga la più frequente neoplasia, con un'incidenza annuale di 214 casi ogni 1000 uomini per circa 2,6 milioni nuovi casi ogni anno, e la seconda causa di morte per neoplasia. Per circa 20 anni con l'introduzione nella pratica clinica di PSA (antigene specifico della prostata), c'è stato infatti un notevole aumento nella diagnosi di neoplasia, a cui, tuttavia, ha corrisposto solo un lieve aumento della mortalità, che propone il problema della PCa clinicamente non significativo e il rischio di sovra-trattamento. Parecchi studi indicano che uno stress ossidativo è associato con molte malattie degenerative, tra cui i tumori. Agli alti livelli dei radicali liberi sono stati trovati nei pazienti con una carenza cronica di antiossidanti, causati da una dieta sempre più povera e artificiale. Uno studio effettuato nel 2015 ha evidenziato che il quotidiano apporto di antiossidanti nei pazienti con PCa induce una riduzione significativa del PSA [1].
Secondo i ricercatori indica un vero e proprio rallentamento della progressione della malattia. Recentemente, i ricercatori hanno identificato alcuni componenti antiossidanti di piante che sembrano in gra- do di inibire il movimento delle cellule tumorali e indebolire i loro segnali chimici, elementi che sono alla base della capacità del tumore di generare metastasi [2]. Questo non è per dire che l'assunzione di antiossidanti è una cura per la PCa, ma che un alto indice ossidativo non diagnosticato, contribuisce all'evoluzione della malattia tumorale. Ecco perché c'è ancora una drammatica elevata incidenza di recidive.
Ad oggi, i principali strumenti dia- gnostici per il tumore della prostata includono l'esplorazione digito-rettale della prostata (DRE), ecografia transrettale e PSA. Il DRE deve essere sempre il primo approccio

diagnostico ed ha lo scopo di apprezzare la forma, la consistenza, la tenerezza e circa il volume della ghiandola, così come la presenza di noduli so- spetti. Ecografia trans- rettale esegue principalmente il compito di evidenziare le zone di ultrasuono dubbioso e migliorare l'accuratezza della biopsia della prostata, che è l'unica indagine che permette di effettuare una determinata diagnosi di neoplasia. Il PSA è ancora oggi il più utilizzato marcatore serico. Si tratta di una glico- proteina prodotta quasi esclusivamente dalle cellule epiteliali della prostata e, dati fondamentali, costituisce un indicatore di organo e non del cancro; pertanto un'elevazione dei suoi valori può verificarsi anche in presenza di altre patologie prostatiche (iperplasia prostatica benigna, prostatite). Si tratta di una proteasi della serina della famiglia callicreine tessuto umano, codificato da un gene localizzato sul cromosoma 19, che è prodotto dalle cellule epiteliali colonnari secretorie ed è contenuto nel liquido seminale. La funzione del PSA è di mantenere il liquido spermatico che coagula, permettendo lo spostamento dello sperma, il PSA è altamente specifico per il tessuto della prostata, come nessun altro tessuto lo produce. Il PSA libero si trova libero nel plasma, mentre il PSA rilegato è complessato a proteine come alfa-1-antichimotripsina e alfa-2- macroglobulina. La frazione legata all'alfa-1-anti - chimotripsina può essere valutata nel siero. Nei primi anni dell'uso clinico del PSA libero le principali linee guida internazionali avevano adottato un valore di soglia di 4 ng / ml, poi abbas- sato da alcuni autori a 2,5 ng / mL. Infatti, per alcuni anni è stato ampiamente dimostrato che non è possibile stabilire una soglia minima che si può tranquillamente escludere la presenza di un carcinoma prostatico.
Uno studio americano ben noto [3], condotto su circa 3000 uomini hanno mostrato un rischio di neoplasia di circa il 25% per i valori di PSA fra 2 e 4 ng / ml e circa l'8% per i valori inferiore a 1 ng / ml. Pertanto il PSA libero ha mostrato una bassa specificità diagnostica ed è scarsamente affidabile per selezionare i tumori clinicamente significativi. Per questo motivo, nel corso degli anni che è stato provato per migliorare la specificità del PSA con alcune delle sue varianti come il rapporto tra PSA libero e totale, che trova la sua ragion d'essere nel fatto che cellule neoplastiche della prostata producono meno PSA in forma libera rispetto ai beni cellule di GN.
La valutazione di queste due frazioni di PSA, ha mostrato che le alterazioni che interes- sano il PSA libero si trovano principalmente in ipertrofia prostatica benigna, mentre le alterazioni nei livelli di PSA collegato sono spesso causa di malattie maligne. Pertanto più basso è il rapporto, più il rischio di cancro aumenta. Ad esempio, quando il valore scende sotto 0,10 (< 0.10) il rischio di PCa è stimato al 56%. Negli ultimi mesi, tra le varie isoforme PSA, il - 2proPSA ha suscitato un certo interesse. È un precursore del PSA free ed è tipicamente associato con carcinoma della prostata. L'uso di questo marcatore migliora significati- vamente la specificità diagnostica del PSA libero totale / rapporto di PSA in pazienti con valori di PSA libero tra 2,5 e 10 ng / ml.
In passato quasi tutti i medici considerati normali valori di PSA uguali a o inferiore a 4.0 ng / ml, quindi sarebbe indicata biopsia della prostata per PCa research in un soggetto con valori sopra 4.0 ng / mL. A complicare la situazione, ricordate che il servizio sanitario nazionale identifica il valore 3.0 ng / ml, l'Università di Havard imposta proporzionale all'età i limiti normali.

2. Protocollo sperimentale

2.1. Soggetti e trattamenti per i pazienti osservati

In questa indagine sono stati reclutati dopo aver dato il loro consenso informato presso la clinica di Urologia Oncologica AIMI.
50 soggetti di sesso maschile invecchiati 60 a 75 con una chiara diagnosi di PCa, sotto terapia ufficiale del cancro, sono stati divisi in due gruppi, **il primo gruppo (gruppo I) non trattato e il secondo gruppo (gruppo II) trattati giornalmente per via orale con un specifico CIZ / protocollo PRZ ed esaminati per un periodo o f circa quattro mesi**.
Durante lo studio i seguenti dati clinici raccolti ogni settimana, sono stati analizzati in tutti i pazienti: libero e totale PSA, densità PSA, PHI, PCA3, testosterone, fibrinogeno, fosfatasi acida prostatica e zinco. Questi parametri clinici sono stati confrontati con i dati iniziali ottenuti prima del trattamento.
CIZ e PRZ sono stati ottenuti da CITOZEATEC, s.r.l. (Peschiera Borromeo, Milano, Italia).

I componenti principali di CIZ sono come segue (unità/100 g): 500 mg di vitamina C; 56 mg di vitamina B5; 56 ìg di vitamina D; 3, 3 mg di vitamina B9; 222 mg di acido piruvico; 120 mg di acido citrico; 250 mg di acido tartarico.
PRZ è una miscela di: acido glutammico (24,5 mg/mL), cisteina dell'acetile (19,3 mg/mL), carbonato di calcio (18 ìg/ mL), acido citrico (140 mg/mL), acido tartarico (122,5 mg/mL), sorbitolo (28 mg/mL) e mannitolo (14 mg/ mL).

2.2. Analisi biologiche

Il PSA è ancora oggi il marcatore più utilizzato. Si tratta di una glicoproteina prodotta quasi esclusivamente dalle cellule epiteliali della prostata e, dati fondamentali, costituisce un indi- catore di organo e non del cancro; pertanto un'elevazione dei suoi valori può verificarsi anche in presenza di altre patologie prostatiche (iperplasia prostatica benigna, prostatite). È una proteasi della serina della famiglia callicreine tessuto umano, codificato da un gene localizzato sul cromosoma 19, che è prodotto dalle cellule epiteliali colonnari secretorie ed è contenuto nel liquido seminale. **La funzione del PSA è di mantenere il liquido spermatico che coagula, permettendo lo sperma spostarsi.**

PSA è altamente specifico per il tessuto della prostata, come nessun altro tessuto lo produce. PSA libero si trova libero nel plasma, mentre il PSA rilegato è complessato a proteine come alfa-1antichimotripsina e alfa-2-macroglobulina. La frazione legata all'alfa-1-antichimotripsina possa essere valutata in siero. Nei primi anni di utilizzo clinico del PSA libero le principali linee guida internazionali avevano adottato un valore di soglia di 4 ng / ml, poi abbassato da alcuni autori a 2,5 ng / mL. Infatti, per alcuni anni è stato ampiamente dimostrato che non è possibile stabilire una soglia minima che si può tranquillamente escludere la presenza di un carcinoma prostatico.

PCA3: PCA3 è un gene sovraespresso nel 95% dei casi di carcinoma della prostata. Il valore del RNA messaggero (mRNA) di PCA3 ricercato nelle cellule urinarie, dopo il massaggio della prostata, è aumentato a 60 - 100 volte nel 95% dei tumori della prostata rispetto a ciò che è osservato in cellule normali della prostata. Inoltre, il valore è indipendente del volume della prostata, infiammazione, il tasso del sangue PSA e il numero di biopsie già effettuate. La densità di PSA: PSA densità esprime il rapporto tra il PSA e la dimensione misurata ecografia della ghiandola e si basa sul fatto che la quantità di PSA prodotto per grammo di tessuto è molto maggiore nel cancro rispetto a ipertrofia. La densità di PSA, infatti, aumenterebbe l'accuratezza diagnostica del PSA nei pazienti in cui il valore del marcatore è fra 4 e 10 ng / ml.

Indice PHI: i problemi derivanti dalla limitata ca- pacità del PSA, suggeriscono la presenza di un tumore della prostata clinicamente significativo, ha permesso di inserire un indicatore chiamato PHI (Prostate Health Index), che deriva da un'elaborazione matematica dei dati relative a tre analisi: totale PSA, PSA libero e - 2proPSA. -2proPSA è una frazione della molecola del PSA è misurata nel sangue dopo un campione normale (p2PSA / PSA free radice quadrata PSA totale).

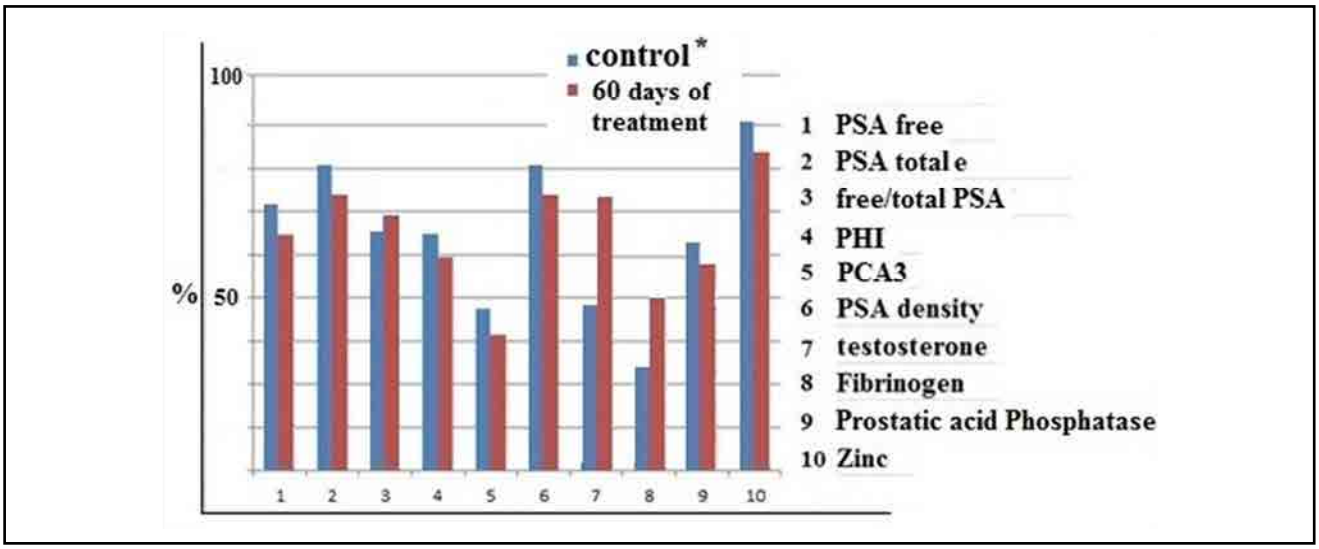
Testosterone: una connessione tra il livello di testosterone e l'insorgenza di PCahas è stato istituito, a partire dal fatto che PCacells sono inizialmente ormono-sensibile. **Bassi livelli di testosterone sono associati con i tumori più aggressivi** in pazienti che hanno sviluppato la PCa [4]. Tuttavia, ciò non significa che avere bassi livelli di testosterone costituisce un rischio o che correggere i livelli di testosterone in quei soggetti porta ad un ridotto rischio di sviluppare il cancro della prostata. Questa associazione può darci un'indicazione impor- tante di come si evolverà il tumore prima di sottoporre un paziente a chirurgia e quindi aiutarci a scegliere la migliore terapia per il singolo caso. **L'argomento è ancora controverso**, infatti, anche se il testosterone è storicamente considerato un nemico della prostata, recenti evidenze cliniche e precliniche hanno invertito questa visione. Un grande studio prospettico [5] potrebbe dimostrano chiaramente che non esiste alcuna asso ciazione tra la concentrazione di testosterone del sangue e il rischio di carcinoma della prostata.

Fibrinogeno: globulina che interviene con altri fattori di coagulazione per promuovere la coagulazione del sangue, come si trasforma in fibrina. Valori di 200-400 mg/100 mL sono considerati normali. Valori inferiori a quelli considerati normali può essere determinati da carcinoma della prostata.

Fosfatasi acida prostatica: fosfatasi acida è un enzima che può essere misurato nel sangue, prodotto dalla prostata, milza, fegato, globuli rossi, piastrine e midollo osseo. Il dosaggio della frazione prostatica serve in particolare per confermare o non il sospetto di carcinoma della prostata. Sono considerati valori normali della fosfatasi acida prostatica fino a 4,2 mU / mL. Valori superiori a quelli considerati normali possono essere determinati da carcinoma della prostata e l'ipertrofia della prostata.

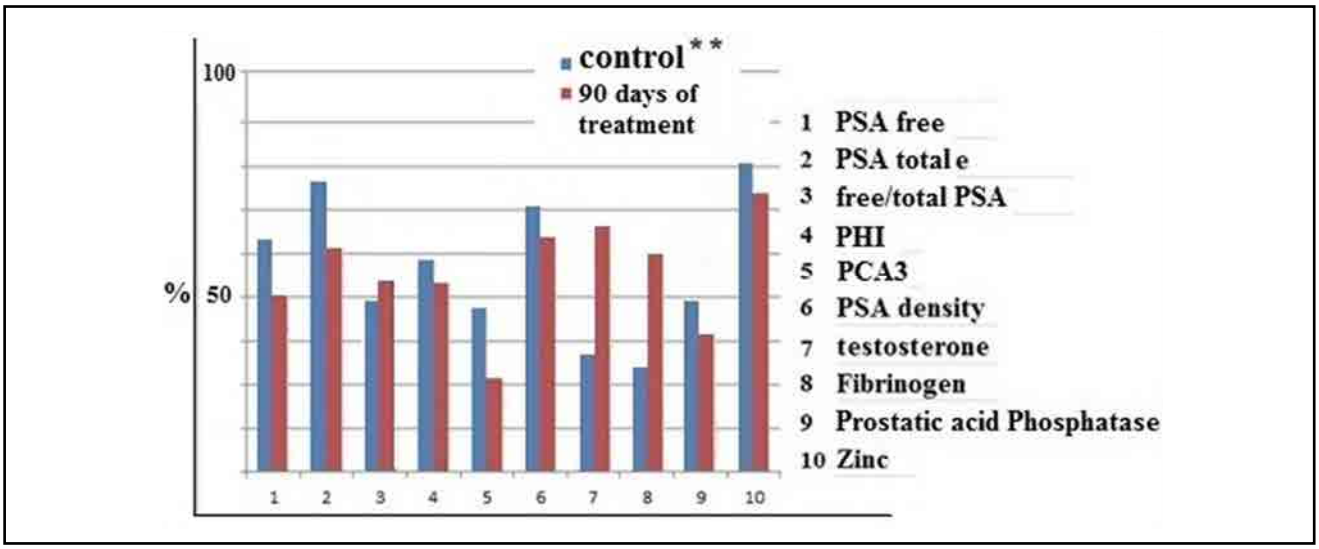
Zinco: elemento essenziale per la normale crescita, lo sviluppo del organi genitali, attività normale della prostata, la guarigione della ferita, produzione di proteine; controlla l'attività di più di 100 enzimi ed è coinvolto nel funzionamento dell'insulina. Piccole quantità di questo elemento sono presenti in molti alimenti come carne magra, pane e cereali integrali, fagioli secchi e gli alimenti marini. Valori normali: 80160mg / 100mL.

Figura 1



Percentuale di variazione dei parametri clinici osservati in 50 soggetti di età 60-75 con una chiara diagnosi di PCa, sotto terapia ufficiale del cancro, sono stati divisi in due gruppi. Il primo gruppo ***non trattata*** *e il secondo gruppo* ***trattati oralmente per 60 giorni****, con un specifico CIZ / protocollo PRZ ed esaminati per un periodo di circa quattro mesi. I dati osservati hanno mostrato variazioni di meno del 15%.*

Figura 2

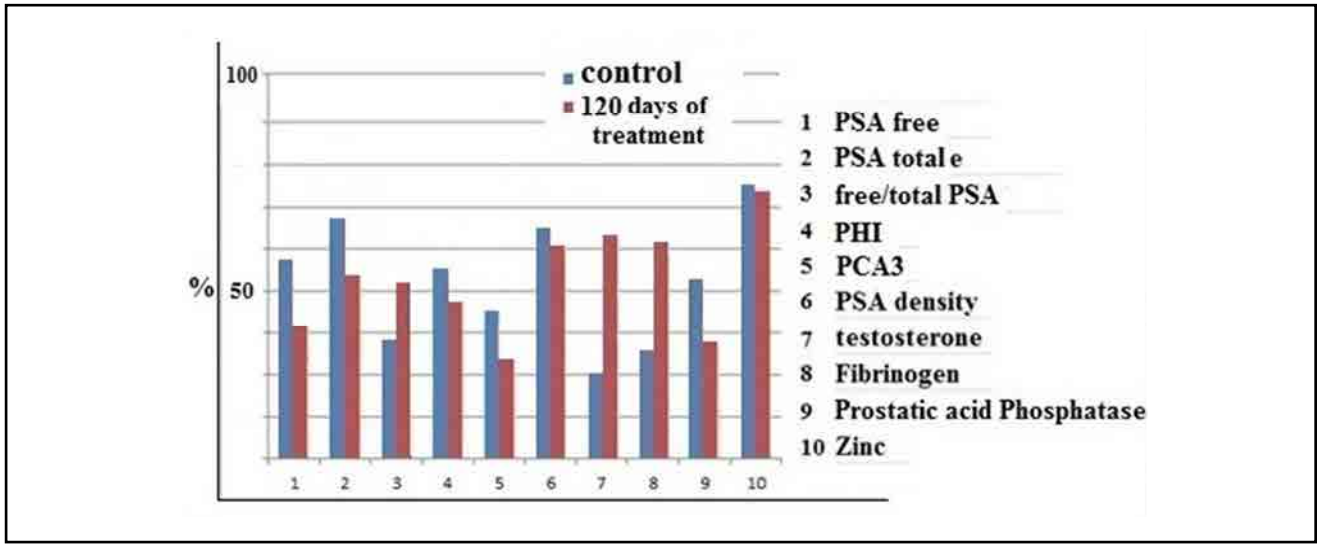


Percentuale di variazione dei parametri clinici osservati in 50 soggetti di età 60-75 con una chiara diagnosi di PCa, sotto terapia ufficiale del cancro, sono stati divisi in due gruppi. Il primo gruppo ***non trattata*** *e il secondo gruppo* ***trattati oralmente per 90 giorni****, con un specifico CIZ / protocollo PRZ ed esaminati per un periodo di circa quattro mesi. I dati osservati hanno mostrato variazioni di meno del 15%.*

3. Risultati

Questo studio è stato progettato sulla base di una prova preliminare che ha evidenziato l'attività positiva di Citozym in un modello dell'ipertrofia prostatica benigna [6]. Dal confronto dei parametri clinici dei 40 pazienti esaminati dopo 60, 90 e 120 giorni di somministrazione, dei due integratori in questione, emerge che la terapia antitumorale, a cui sono sottoposti, mostra un netto miglioramento. Trattamento dei dati è stata effettuata confrontando i parametri riportati nella sezione per i valori del gruppo I. PHI è ridotto del 14%, PCA3 del 30% e PAP del 25%. I valori di zinco e la densità di PSA è rimasta invariati. È interessante sottolineare il mantenimento dei livelli di testosterone hanno esercitato solo tramite la terapia antitumorale, contrastata dal contemporaneo trattamento con antiossidanti, con un evidente aumento totale da tempo 0 di circa il 46%.

Figura 3



Percentuale di variazione dei parametri clinici osservati in 50 soggetti di età 60-75 con una chiara diagnosi di PCa, sotto terapia ufficiale del cancro, sono stati divisi in due gruppi. Il primo gruppo ***non trattata*** *e il secondo gruppo* ***trattati oralmente per 120 giorni****, con un specifico CIZ / protocollo PRZ ed esaminati per un periodo di circa quattro mesi. I dati osservati hanno mostrato variazioni di meno del 15%.*

4. Discussione

Parecchi studi indicano che alto stress ossidativo è associato con molte malattie degenerative, tra cui i tumori. Alti livelli dei radicali liberi sono stati trovati nei pazienti con una carenza cronica di antiossidanti causati da una dieta sempre più povera e artificiale. Uno studio effettuato nel 2015 ha evidenziato il quotidiano apporto di antiossidanti dai pazienti con PCa induce una riduzione significativa del PSA [1].

Secondo i ricercatori indica un vero e proprio rallentamento della progressione della malattia. Recentemente, altri ricercatori hanno identificato **alcuni componenti del melograno** che sembrano in **grado di inibire il movimento delle cellule tumorali e indebolire i loro segnali chimici**, elementi che sono alla base della capacità del tumore della prostata e di generare metastasi fino all'osso. Questo non è per dire che l'assunzione di antiossidanti è una cura per la PCa, ma che un alto sress ossidativo non diagnosticato, contribuisce all'evoluzione della malattia tumorale. **In altre parole, attuale oncologia** si concentra correttamente sulla riduzione del tumore della massa ma non interviene sul terreno biologico che l'ha prodotta. **Ecco perché c'è ancora una drammaticamente elevata incidenza di recidive**.

Sulla base di queste considerazioni, il successo di terapia può essere condizionato dagli antiossidanti presenti nel nostro corpo, che può essere sintetizzato de novo (endogeno) o incorporate attraverso la dieta ed i supplementi nutrizionali (esogeni). Anche se le cellule possiedono un vasto repertorio di enzimi e antiossidanti, a volte questi agenti sono insufficienti per normalizzare lo stato redox, prodotto da un intenso stress ossidativo [7].

In questi casi, i supplementi dell'antiossidante esogeno possono essere necessari per ripristinare l'omeostasi redox cellulare [8]. È stato suggerito che l'azione antiossidante può proteggere contro lo stress ossidativo connesso con lo sviluppo di determinate malattie o che può inibirne la formazione di molecole ossidanti. Cancro e antiossidanti stanno acquisendo grande importanza, si ritiene che gli antiossidanti possono impedire lo sviluppo di cancro dovuto i loro effetti sulla regolazione del ciclo cellulare, infiammazione, l'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali e dell'invasività, l'induzione di apoptosi.
La riduzione del PSA libero e totale ha aumentato il rapporto libero totale di PSA.
Questi dati, oltre a rappresentare un'osservazione positiva, potrebbero spiegare la riduzione del PHI, e dell'attività della fosfatasi acida prostatica, oltre che alla riduzione di PCA3. È anche possibile disegnare da i valori ottenuti, l'osservazione del miglioramento della condizione generale del paziente, grazie all'aumento dei livelli di testosterone, noto protettore della salute della prostata [1]. Il testosterone è essenziale per la normale crescita, cito-differenziazione e manutenzione del tessuto della prostata [10]. Livelli di testosterone alto precedentemente sono stati considerati per condurre allo sviluppo potenziale di PCa e più rapida crescita del tumore [11,12]. Tuttavia, gli studi sull'associazione fra testosterone e PCa rischio hanno prodotto risultati contrastanti [10,11].
Numerosi studi hanno dimostrato che valori di bassi, piuttosto che alti, livelli di testosterone alla diagnosi sono stati associati con i vari indicatori di prognosi, tra cui stadio patologico avanzato, per alti punteggi di Gleason, i livelli elevati di PSA, vescichetta seminale invasione e margini chirurgici positivi [13,14]. Pochi studi hanno ulteriormente determinato se bassi livelli di testosterone predicono la prognosi. I dati sui 120 giorni di trattamento in sospeso è già possibile una deduzione preliminare, che la terapia adiuvante con CYZ e PRZ, sembra migliorare i parametri biochimici dei pazienti affetti da carcinoma della prostata. Di conseguenza, in precedenti studi, hanno chiarito i meccanismi alla base dell'attività di questo nutraceutico, nel trattamento dei tumori della prostata e la riduzione degli effetti collaterali della chemioterapia. In conclusione, i risultati del presente studio potrebbero avere importanti implicazioni cliniche per la gestione e il trattamento dei pazienti con carcinoma prostatico.

Bibliografia

[1] Rahul K. Lall, Deeba N. Syed, Vaqar M. Adhami, Mohammad Imran Khan, and Hasan Mukhtar. Dietary Polyphenols in Prevention and Treatment of Prostate Cancer. Int J Mol Sci. 2015;16(2): 3350–3376. [2] Byeongsang Oh, Gemma Figtree, Daniel Costa, Thomas Eade, George Hruby, Stephanie Lim, Ay- men Elfiky, Neil Martine, David Rosenthal, Stephen Clarke, Michael Back. Oxidative stress in prostate cancer patients: A systematic review of case control studies. Prostate Int. 2016; 4: 71-87

[3] Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG , Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level. N Engl J Med. 2004;350(22):2239-2246.

[4] Huakang Tu, Jian Gu, Qing H. Meng, Jeri Kim, Sara Strom, John W. Davis, Yonggang He, Elizabeth A. Wagar,Timothy C. Thompson, Christopher J. Logothetis, and Xifeng Wu. Low serum testosterone is associa- ted with tumor aggressiveness and poor prognosis in prostate cancer. Oncol Lett. 2017 Mar; 13(3): 1949–1957. [5] Roddam AW,Allen NE, Appleby P, Key TJ. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. J Natl Cancer Inst. 2008;100(3):170-183.

[6] Torricelli P. , Ferorelli P. , De Martino A. , Antonelli F. , Beninati S. Preventive effects of a mixture of mi- cronutrients with antioxidative properties on experimentally induced prostate hyperplasia American Journal of Life Sciences. 2013; 1(1) : 22-26

[7] Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. Biomed Res Int. 2014;2014:404680

[8] Jaouad Bouayed, Torsten Bohn. Exogenous antioxidants: Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. Oxid Med Cell Longev.

[9] Dietary Antioxidants and Prostate Cancer: A Review. Terrence M. Vance, Joseph Su, Elizabeth T. H. Fontham, Sung I. Koo,andOck K. Chun. Nutr Cancer. 2013; 65(6): 10.1080/01635581.2013.806672

[10] Isbarn H, Pinthus JH, Marks LS, Montorsi F, Morales A, Morgentaler A, Schulman C. Testosterone and prostate cancer: Revisiting old paradigms. Eur Urol. 2009;56:48–56.

[11] Klap J, Schmid M, Loughlin KR. The relationship between total testosterone levels and prostate cancer: A review of the continuing controversy. J Urol. 2015;193:403–413.

[12] Morgentaler A. Testosterone and prostate cancer: An historical perspective on a modern myth. Eur Urol. 2006;50:935–939. Paixão RL, Schramm FR. Ethics nd animal experimentation: what is debated? Cad Saude Publica. 1999; 15 Suppl 1: 99-110.

[13] García-Cruz E, Piqueras M, Huguet J, Peri L, Izquierdo L, Musquera M, Franco A, Alvarez-Vijande R,

[14] Ribal MJ, Alcaraz A. Low testosterone levels are related to poor prognosis factors in men with prostate cancer prior to treatment. BJU Int. 2012;110:E541–E546.

[15] Botto H, Neuzillet Y, Lebret T, Camparo P, Molinie V, Raynaud JP. High incidence of predominant Gleason pattern 4 localized prostate cancer is associated with low serum testosterone. J Urol. 2011;186:1400– 1405.

Prof. S. Beninati, Responsabile Lab. Istologia-Oncologia
Università di Roma "Tor Vergata"

Dott. Francesco Antonelli,
Assistente alla ricerca

International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research
2018; 3(2): 14-19
http://www.sciencepublishinggroup.com/j/ijcocr
doi: 10.11648/j.ijcocr.20180302.11

Correlations Between Administration of Food Supplements with Marked Antioxidant Properties and Clinical Parameters in Patients with Prostate Carcinoma

Torricelli Piera[1], Antonelli Francesco[2], Ferorelli Pasquale[2], Shevchenko Anna[3], Lenzi Stefano[4], Beninati Simone[2, *]

[1]Department of Urology, Hospital "A. Cardarelli", Campobasso, Italy

[2]Department of Biology, University of Tor Vergata, Rome, Italy

[3]Department of Science, People's Friendship University of Russia, Moscow, Russia

[4]Department of Medicine, Université Européenne Jean Monnet, Bruxelles, Belgium

Email address:
beninati@bio.uniroma2.it (B. Simone)

[*]Corresponding author

To cite this article:
Torricelli Piera, Antonelli Francesco, Ferorelli Pasquale, Shevchenko Anna, Lenzi Stefano, Beninati Simone. Correlations Between Administration of Food Supplements with Marked Antioxidant Properties and Clinical Parameters in Patients with Prostate Carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research*. Vol. 3, No. 2, 2018, pp. 14-19. doi: 10.11648/j.ijcocr.20180302.11

Received: March 26, 2018; **Accepted**: April 12, 2018; **Published**: May 10, 2018

Abstract: Several studies indicate that high oxidative stress is associated with various degenerative diseases, including tumors. The high levels of free radicals present in many patients derive from the chronic lack of antioxidants, caused by an increasingly poor and artificial diet. The study presented in this research, conducted on 50 male volunteers, carriers of Prostatic Carcinoma (PCa) at different stages of development and under current therapy, showed that the daily intake of antioxidants contained in two food supplements, Citozym (CIZ) and Propulzym (PRZ), induces a significant increase of the ratio free/total PSA and also a reduction of various clinical parameters, correlated with PCa. This result suggests a potential slowdown in the progression of the disease. This study was planned on the basis of a recent preliminary trial, that highlighted the positive activity of CIZ in a model of benign prostatic hypertrophy. Studies are in progress to identify the components present in these food supplements affecting biochemical signals, elements that underlie the ability of PCa to progress. This does not mean that the intake of antioxidants is a cure for PCa, but that a high undiagnosed oxidative stress, much less correct by the standard oncological approaches, contributes to the evolution of the tumor disease. In other words, current oncology focuses correctly on reducing the tumor mass, but does not intervene on the biological medium that produced it. This is why there is still a dramatic incidence of relapses.

Keywords: Food Supplements, Antioxidants, Prostate Carcinoma, Oxidative Stress

1. Introduction

PCa is recognized as one of the main medical problems facing the male population. In Europe, it is by far the most frequent neoplasia, with an annual incidence of 214 cases per 1000 men for an estimated 2.6 million new cases each year, and the second leading cause of death by neoplasm. For about 20 years with the introduction into the clinical practice of PSA (specific prostate antigen) there has indeed been a noticeable increase in the diagnosis of the neoplasm, to which, however, has corresponded only a slight increase in mortality, posing the problem of PCa clinically not significant and the risk of over-processing. Several studies indicate that high oxidative stress is associated with many degenerative diseases including tumors. To contribute heavily to the high levels of free radicals found in patients is a chronic deficiency of antioxidants caused by an increasingly poor and artificial diet. A study carried out in 2015 highlighted the daily intake of antioxidants by patients with PCa induces a significant reduction in PSA [1]. This according to the researchers indicates a real slowing down of the progression of the disease. Recently, researchers have identified some antioxidant components of plants that seem able to inhibit the movement of cancer cells and weaken their chemical signals, elements that are at the base of the

tumor's ability to generate metastases [2]. This is not to say that intake of antioxidants is a cure for PCa but that a high undiagnosed oxidative stress, much less correct by standard oncological approaches, contributes to the evolution of tumor disease. In other words, current oncology focuses correctly on reducing the tumor mass but does not intervene on the biological soil that produced it. This is why there is still a dramatically high incidence of relapses.

To date, the main diagnostic tools for prostate tumor include the digito-rectal prostate (DRE) scan, trans-rectal ultrasound and PSA. The DRE must always be the first diagnostic approach and has the purpose of appreciating the shape, the consistency, the tenderness and approximately the volume of the gland, as well as the presence of suspicious nodules. Trans-rectal ultrasound mainly performs the task of highlighting areas of doubtful ultrasound and improving the accuracy of prostate biopsy, which is the only investigation that allows to make a certain diagnosis of neoplasia. The PSA is still today the most used silky marker. It is a glycoprotein produced almost exclusively by the epithelial cells of the prostate and, fundamental data, constitutes an organ marker and not of cancer; therefore an elevation of its values can also occur in the presence of other prostatic pathologies (Benign Prostatic Hyperplasia and prostatitis). It is a serine protease of the human tissue callicreine family, encoded by a gene located on chromosome 19, which is produced by secretory columnar epithelial cells and is contained in the ejaculate. The function of the PSA is to keep the spermatic fluid that coagulates, allowing the sperm to move. PSA is highly specific for prostate tissue, as no other tissue produces it. Free PSA is found free in the plasma, while the bound PSA is complexed to proteins such as alpha-1-antichymotrypsin and alpha-2-macroglobulin. The fraction linked to alpha-1-anti -chymotrypsin can be evaluated in serum.

In the early years of the clinical use of free PSA the main international guidelines had adopted a threshold value of 4 ng / mL, then lowered by some authors to 2.5 ng / mL. In fact, for some years it has been widely demonstrated that it is not possible to establish a minimum threshold that can safely rule out the presence of a prostatic carcinoma. A well-known US study [3], conducted on about 3000 men showed a risk of neoplasm of about 25% for PSA values between 2 and 4 ng / mL and about 8 % for values less than 1 ng / mL. Therefore, by lowering the PSA reference value there is an increase in the diagnosis of new cases of prostatic neoplasia, but with an increase in the incidence of non-significant tumors, whose natural history does not affect survival. Therefore, the free PSA shows a low diagnostic specificity and is poorly reliable to select clinically significant tumors. For this reason, over the years it has been tried to improve the specificity of PSA with some of its variants such as the relationship between free and total PSA, which finds its rationale in the fact that neoplastic prostate cells produce less PSA in free form than to benign cells. The evaluation of these two fractions of PSA, showed that alterations affecting free PSA are found mainly in benign prostatic hypertrophy, while alterations in the levels of linked PSA are often due to malignant diseases. Therefore, the lower the ratio, the more the risk of cancer increases. For example, when the value falls below 0.10 (<0.10) the risk of PCa is estimated at 56%. In recent months, among the various PSA isoforms, the -2proPSA has aroused some interest. It is a precursor of free PSA and is typically associated with prostate cancer. The use of this marker significantly improves the diagnostic specificity of the free PSA/total PSA ratio in patients with values of free PSA between 2.5 and 10 ng / mL. In the past almost all doctors considered normal PSA values equal to or less than 4.0 ng / mL, so prostate biopsy for PCa research would be indicated in a subject with values above 4.0 ng / mL. To complicate the situation, remember that there is no unanimity on the upper limit of normality, for example the National Health Service identifies the value 3.0 ng / mL, the Havard University sets normal limits proportional to age.

2. Experimental Protocol

2.1. Subjects and Treatments

The patients observed in this survey were recruited after having given their informed consent at AIMI oncological urology clinic. 50 male subjects aged 60 to 75 with a clear diagnosis of PCa, under official cancer therapy, were divided into two groups, the first group (25 patients-Group I) untreated and the second group (25 patients-Group II) treated daily orally with a specific CIZ / PRZ protocol and examined for a period of about four months. During the study the following clinical data collected weekly, were analyzed in all patients,: free and total PSA, PSA density, PHI, PCA3, testosterone, fibrinogen, prostatic acid phosphatase (PAP) and zinc. These clinical parameters were compared with the initial data, placed at 100, obtained before treatment. CIZ and PRZ were obtained from CITOZEATEC, S.r.l. (Peschiera Borromeo, Milano, Italy). The main components of CIZ are as follows (units/100 g): 500 mg of vitamin C; 56 mg of vitamin B5; 56 µg of vitamin D; 3, 3 mg of vitamin B9; 222 mg of pyruvic acid; 120 mg of citric acid; 250 mg of tartaric acid. PRZ is a mixture of glutamic acid (24.5 mg/mL), acetyl cysteine (19.3 mg/mL), calcium carbonate (18 µg/mL), citric acid (140 mg/mL), tartaric acid (122.5 mg/mL), sorbitol (28 mg/mL) and mannitol (14 mg/mL).

2.2. Bioassays

PSA: PSA is still today the most used marker. It is a glycoprotein produced almost exclusively by the epithelial cells of the prostate and, fundamental data, constitutes an organ marker and not of cancer; therefore an elevation of its values can also occur in the presence of other prostatic pathologies (Benign Prostatic Hyperplasia, prostatitis). It is a serine protease of the human tissue callicreine family, encoded by a gene located on chromosome 19, which is produced by secretory columnar epithelial cells and is contained in the ejaculate. The physiological function of the PSA is to keep the sperm fluid after ejaculation, allowing the spermatozoa to move more easily through the cervix. PSA is highly specific for prostate tissue, as no other tissue produces it. Free PSA is

found free in the plasma, while the bound PSA is complexed to proteins such as alpha-1-antichymotrypsin and alpha-2-macroglobulin. The fraction linked to alpha-1-antichymotrypsin can be evaluated in serum. In the early years of clinical use of free PSA the main international guidelines had adopted a threshold value of 4 ng / mL, then lowered by some authors to 2.5 ng / mL. In fact, for some years it has been widely demonstrated that it is not possible to establish a minimum threshold that can safely rule out the presence of a prostatic carcinoma. For this reason the free / total PSA ratio is actually considered more reliable from the prognostic point of view. An increase in this value indicates the reduction of tumor progression.

PCA3: PCA3 is a gene overexpressed in 95% of cases of prostate carcinoma. The value of the messenger RNA (mRNA) of the PCA3 researched in the urinary cells, after prostate massage, is increased 60-100 times in 95% of prostate tumors compared to what is observed in normal prostate cells. In addition, its value is independent of the volume of the prostate, inflammation, the rate of blood PSA and the number of biopsies already performed.

PSA density: PSA density expresses the relationship between the total PSA and the measured trans-rectal ultrasound size of the gland, and is based on the fact that the amount of PSA produced per gram of tissue is much greater in cancer than in hypertrophy. PSA density would, in fact, increase the diagnostic accuracy of PSA in patients in whom the marker value is between 4 and 10 ng / mL.

PHI index: the problems arising from the limited ability of the PSA to accurately suggest the presence of a clinically significant prostate tumor allowed to insert a marker called PHI (Prostate Health Index) which derives from a mathematical processing of the data related to three analyzes: total PSA, free PSA and -2proPSA. -2proPSA is a fraction of the PSA molecule that is measured in the blood after a normal sample (p2PSA / PSA free square root PSA total).

Testosterone: a connection between the levels of testosterone and the onset of PCa has been established, starting from the fact that PCa cells are initially hormone-sensitive. Low testosterone levels are associated with more aggressive tumors in patients who have developed PCa [4]. However, this does not mean that having low testosterone levels constitutes a risk or that correcting testosterone levels in those subjects leads to a reduced risk of developing prostate cancer. This association can give us an important indication of how the tumor will evolve before subjecting a patient to surgery and then helping us to choose the best therapy for the individual case. The argument is still controversial, in fact, although testosterone is historically considered an enemy of the prostate, recent clinical and preclinical evidence have reversed this vision. A very large prospective study could clearly demonstrate that there is no association between the concentration of blood testosterone and the risk of prostate cancer [5].

Fibrinogen: globulin that intervenes with other coagulation factors to promote blood coagulation, as it turns into fibrin. Values of 200-400 mg / 100 mL are considered normal. Values lower than those considered normal can be determined by prostate cancer.

PAP: acid phosphatase is an enzyme that can be measured in the blood, produced by the prostate, spleen, liver, red blood cells, platelets and bone marrow. The dosage of the prostatic fraction serves in particular to confirm or not the suspicion of prostate cancer. They are considered normal values of PAP up to 4.2 mU / mL. Values higher than those considered normal can be determined by prostate hypertrophy and prostate cancer.

Zinc: essential element for normal growth, development of the genital organs, normal prostate activity, wound healing, protein production; controls the activity of more than 100 enzymes and is involved in the functioning of insulin. Small amounts of this element are present in many foods such as lean meat, bread and whole grains, dried beans and marine foods. Normal values: 80-160mg / 100mL.

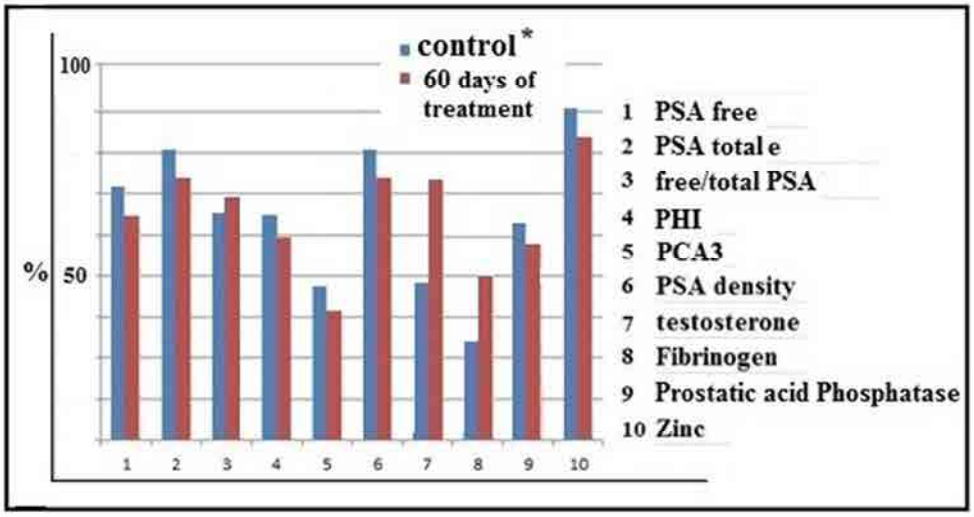


Figure 1. *Percentage variation, compared to initial values, of clinical parameters observed in 50 subjects aged between 60 and 75 years with a clear diagnosis of PCa, under official cancer therapy. Patients were divided into two groups. The first group of control (Group I) untreated and the second group (Group II) treated orally for 60 days, with a specific CIZ / PRZ protocol. Individual data showed variations of less than 15%.*

3. Results

This study was planned on the basis of a preliminary experimental trial that highlighted the positive activity of CIZ in a model of benign prostatic hypertrophy [6]. Comparing the clinical parameters of patients who have not been treated and treated with CIZ / PRZ for 60, 90 and 120 days, a clear improvement in the effect of the antitumor therapy has emerged. Data processing was performed by comparing the parameters reported in the " *Bioassays* " section, among the group of patients treated only with the anticancer therapeutic protocol (Group I) and the group of patients treated both with the antitumor protocol and with the two food supplements under examination (Group II). Figure 1 shows the values obtained after 60 days of treatment of the two experimental groups. The adjuvant function exerted on the antitumor therapy, by the two antioxidants CYZ and PRZ, is particularly evident for free and total PSA, whose values are reduced by 7% and in the ratio free/total PSA increased of about 4%. PCA3 value was reduced of about 7%. The other parameters did not undergo statistically significant changes except for the marked increase in testosterone (30%) and fibrinogen (17%) levels. Figure 2 shows the clinical parameters collected after 90 days in patients of Group I and Group II. The reduction of the observed clinical values is already evident only with the antitumor therapy, but becomes even more marked with the aid of antioxidant treatment. In particular, both the free PSA and the total have been reduced by about 20%, improving the value of the free / total PSA ratio. Remarkable is the increase of both the testosterone level (35%) and the fibrinogen (27%). The level of PAP, appears reduced by 13%. Figure 3 shows the values obtained after 120 days of treatment. Both the free PSA and the total PSA are further reduced in Group II, compared to the values of Group I. PHI is reduced by 12%, PCA3 by 10% and PAP by 15%. Considering the prognostic value of the free / total PSA ratio, the positive result appears the 10% increase of this parameter following 120 days of treatment.. Values for zinc and PSA density remained unchanged. It is interesting to underline the reduction of testosterone levels, exerted by anticancer therapy, in contrast with the evident total increase of 36%, following the simultaneous treatment with the two antioxidants (CIZ/PRZ).

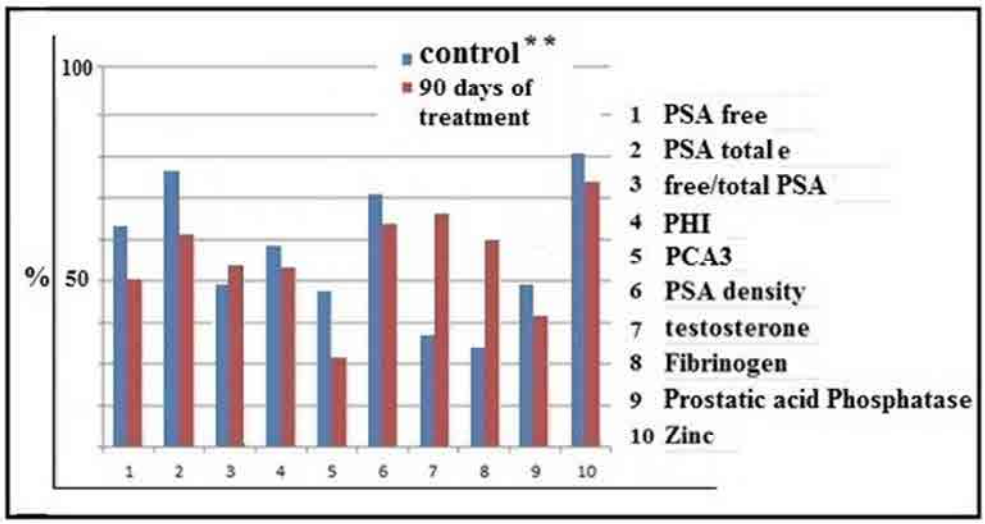


Figure 2. *Percentage variation, compared to initial values, of clinical parameters observed in 50 subjects aged between 60 and 75 years with a clear diagnosis of PCa, under official cancer therapy. Patients were divided into two groups. The first group of control (Group I) untreated and the second group (Group II) treated orally for 90 days, with a specific CIZ / PRZ protocol. Individual data showed variations of less than 15%.*

4. Discussion

Cancer is one of the major heterogeneous diseases with high morbidity and mortality. Despite extensive research and considerable efforts for developing targeted therapies, it is still an alarming condition with a poor prognosis and high mortality. Numerous studies have provided evidence that changes in redox balance and deregulation of redox signaling are common hallmarks of cancer progression and resistance to treatment. Recent studies have demonstrated that cancer cells are highly adapted to elevated levels of reactive oxygen species (ROS) by activating antioxidant pathways. Thus, targeting the ROS signaling pathways and redox mechanisms involved in cancer development are new potential strategies to prevent cancer.

Based on these considerations, therapy success may be conditioned by the antioxidants present in our own body, which can be synthesized *de novo* (endogenous) or incorporated through the diet and nutritional supplements (exogenous). Although cells possess a large repertoire of enzymes and antioxidants, sometimes these agents are insufficient to normalize the redox state produced by an intense oxidative stress [7].

In these cases, exogenous antioxidant supplements may be required to restore the cell redox homeostasis [8]. It has been suggested that antioxidant supplementation may protect

against oxidative stress associated with the development of certain diseases or that it may reverse the oxidative stress produced during their course. In the area of our interest, that is, cancer, antioxidants are acquiring great importance. It is believed that antioxidants can prevent the development of cancer due to their effects on cell cycle regulation, inflammation, the inhibition of tumor cell proliferation and invasiveness, the induction of apoptosis, and the stimulation of the detoxifying enzyme activity [9]. It is interesting to note that it has been reported that daily intake of antioxidants by patients with PCa induces a significant reduction in PSA [1].

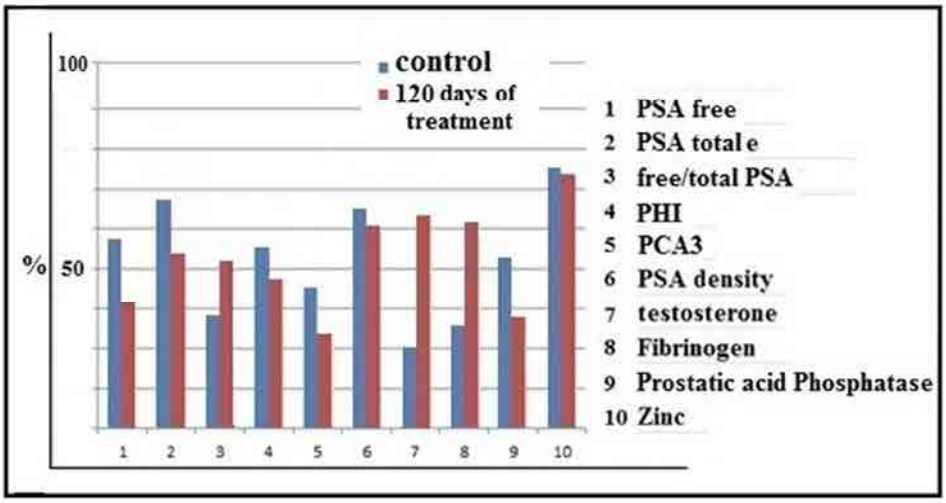


Figure 3. *Percentage variation, compared to initial values, of clinical parameters observed in 50 subjects aged between 60 and 75 years with a clear diagnosis of PCa, under official cancer therapy. Patients were divided into two groups. The first group of control (Group I) untreated and the second group (Group II) treated orally for 120 days, with a specific CIZ / PRZ protocol. Individual data showed variations of less than 15%.*

In the present study, two known antioxidant mixtures were administered as adjuvant, during the antitumor therapeutic treatment of patients with PCa. The most interesting data obtained was that of observing a more effective reduction of some biochemical parameters correlated with the evolution of the tumor. In particular, the reduction of free and total PSA observed, has increased the free/total PSA ratio. This data, besides representing a positive observation, could explain the reduction of PHI, of PSA density and of the activity of PAP, as well as the reduction of PCA3. It is also possible to draw from the values obtained, the observation of the improvement of the general condition of the patient (data not shown), thanks to the increase of the levels of testosterone, known protector of the health of the prostate gland [4]. Testosterone is essential for the normal growth, cyto-differentiation and maintenance of prostate tissue [10]. High testosterone levels were previously considered to lead to the potential development of PCa and more rapid growth of the tumor [11, 12]. However, studies on the association between testosterone and PCa risk, have produced conflicting results [10, 11]. Numerous studies have demonstrated that low, rather than high, testosterone levels at diagnosis were associated with various markers of poor prognosis, including an advanced pathological stage, higher Gleason scores, higher PSA levels, seminal vesicle invasion and positive surgical margins [13, 14]. Few studies have further investigated whether low levels of testosterone predict poor prognosis. Pending the data on the 120 days of treatment it is already possible a preliminary deduction, that the adjuvant therapy with CYZ and PRZ, appears to improve the biochemical parameters of patients suffering from prostate cancer, probably due to the protective effect of increased testosterone levels. Therefore, further *in vivo* studies, elucidating the mechanisms underlying the activity of these nutraceuticals, may be useful in the treatment of prostate tumors and reduction of the side effects of chemotherapy. In conclusion the results of the present study may have important clinical implications for the management and treatment of patients with Prostatic Carcinoma.

Acknowledgements

We are grateful to A. I. A. S. Italy, for financial support for studying the possibility of alternative therapies for prostate cancer (project funding n. SBFAPF00218).

References

[1] Rahul K. Lall, Deeba N. Syed, Vaqar M. Adhami, Mohammad Imran Khan, and Hasan Mukhtar. Dietary Polyphenols in Prevention and Treatment of Prostate Cancer. Int J Mol Sci. 2015; 16 (2): 3350–3376.

[2] Byeongsang Oh, Gemma Figtree, Daniel Costa, Thomas Eade, George Hruby, Stephanie Lim, Aymen Elfiky, Neil Martine, David Rosenthal, Stephen Clarke, Michael Back. Oxidative stress in prostate cancer patients: A systematic review of case control studies. Prostate Int. 2016; 4: 71-87.

[3] Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level. N Engl J Med. 2004; 350(22): 2239-2246.

[4] Huakang Tu, Jian Gu, Qing H. Meng, Jeri Kim, Sara Strom, John W. Davis, Yonggang He, Elizabeth A. Wagar, Timothy C. Thompson, Christopher J. Logothetis, and Xifeng Wu. Low serum testosterone is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in prostate cancer. Oncol Lett. 2017 Mar; 13(3): 1949–1957.

[5] Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. J Natl Cancer Inst. 2008; 100(3):170-183.

[6] Torricelli P., Ferorelli P., De Martino A., Antonelli F., Beninati S. Preventive effects of a mixture of micronutrients with antioxidative properties on experimentally induced prostate hyperplasia American Journal of Life Sciences. 2013; 1(1): 22-26.

[7] Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. Biomed Res Int. 2014;2014:404680.

[8] Jaouad Bouayed, Torsten Bohn. Exogenous antioxidants: Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. Oxid Med Cell Longev. 2010 Jul-Aug; 3(4): 228–237.

[9] Terrence M. Vance, Joseph Su, Elizabeth T. H. Fontham, Sung I. Koo, and Ock K. Chun.Dietary Antioxidants and Prostate Cancer: A Review. Nutr Cancer. 2013; 65(6): 217-220.

[10] Isbarn H, Pinthus JH, Marks LS, Montorsi F, Morales A, Morgentaler A, Schulman C. Testosterone and prostate cancer: Revisiting old paradigms. Eur Urol. 2009; 56: 48–56.

[11] Klap J, Schmid M, Loughlin KR. The relationship between total testosterone levels and prostate cancer: A review of the continuing controversy. J Urol. 2015; 193: 403–413.

[12] Morgentaler A. Testosterone and prostate cancer: An historical perspective on a modern myth. Eur Urol. 2006; 50: 935–939.

[13] García-Cruz E, Piqueras M, Huguet J, Peri L, Izquierdo L, Musquera M, Franco A, Alvarez-Vijande R, Ribal MJ, Alcaraz A. Low testosterone levels are related to poor prognosis factors in men with prostate cancer prior to treatment. BJU Int. 2012; 110: E541–E546.

[14] Botto H, Neuzillet Y, Lebret T, Camparo P, Molinie V, Raynaud JP. High incidence of predominant Gleason pattern 4 localized prostate cancer is associated with low serum testosterone. J Urol. 2011; 186: 1400–1405.

8

MOLECOLE ANTICANCRO

8.1 MOLECOLE ANTICANCRO - Ricerca Uniroma 2

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
LABORATORIO DI CITOLOGIA, ISTOLOGIA E ONCOLOGIA SPERIMENTALE

Relazione / esperimenti preliminari del progetto

Effetti dei componenti del Texidrofolico della Soc. Citozeatec di Peschiera Borromeo, sulla crescita cellulare normale e ridotta crescita neoplastica

Responsabili scientifici: Prof. Simone Beninati, Dott. F. Antonelli.

Introduzione

Abbiamo focalizzato il nostro studio sulla ricerca del potenziale effetto sinergico, derivante dalla azione dei diversi costituenti del Citozym, i quali agiscono, non su un singolo bersaglio ma, su diversi target e cooperano in un percorso agonista-sinergico per provocare una potente attività farmacologica.

Il concetto di target include enzimi, substrati, proteine e metaboliti, recettori, canali ionici, proteine di trasporto, DNA / RNA, ribosomi, anticorpi monoclonali, meccanismi fisico-chimici e cascate di segnali [(1)].

Il vantaggio di questa molteplicità di costituenti attivi e delle loro azioni complementari, conferisce al Citozym un'azione delicata, profonda e duratura, rispetto ad un farmaco derivato dalla sintesi chimica, che generalmente consiste in un singolo principio attivo, che avrà un'azione unica, focalizzata e incisiva.

Alcuni componenti del Citozym non hanno effetti farmacologici, ma migliorano la biodisponibilità di altri composti attivi, consentendo così ai composti attivi di essere molto più efficaci in confronto all'azione che manifesterebbero da soli. Questi costituenti, che lavorano in sinergia con altre molecole inattive, sono chiamati **"co-effettori"**.

Il ruolo di alcuni di questi co-effettori può, ad esempio, aumentare la solubilità in acqua, di altri costituenti attivi, oppure aiutare il loro passaggio attraverso le membrane cellulari a livello della parete intestinale, facilitando così la loro diffusione nel sangue. Altri co-effettori possono anche avere un ruolo protettivo, nei confronti dell'azione metabolica degli enzimi coinvolti durante il percorso delle sostanze attive nel corpo, prima che raggiungano il loro sito di azione. Quindi le sostanze attive (enzimi) non possono essere degradate e manterranno tutta la loro attività.

Grazie alla moltitudine di costituenti, il corollario di effetti sinergici coniugati e variabili, la polivalenza di attività complementari, l'efficacia a basse dosi e l'azione concertata e armoniosa di altri costituenti che li accompagnano, il Citozym agirà in modo dolce, profondo e duraturo e potrebbe avere un'azione regolatoria in aggiunta alla propria azione sintomatica.

(1) *Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. Nat Rev Drug Discov 2006 5(10):821-34.*

Razionale della sperimentazione

Al fine di studiare la sinergia fra i diversi componenti di Citozym, abbiamo considerato che l'effetto di questo prodotto è certamente il risultato dell'azione integrata della molteplicità di sostanze che lo compongono, e non può essere semplicemente riprodotto con l'isolamento di uno o più principi attivi. Il fine è dimostrare che la presenza in Citozym di molecole farmacologicamente inattive influenza l'assorbimento, la stabilità e il rilascio di determinati principi attivi, andando ad agire sulla loro biodisponibilità.

Risultati e Discussione

I singoli componenti più significativi sono stati utilizzati puri e alla concentrazione normalmente utilizzata per la sperimentazione su varie patologie. In particolare i principi attivi utilizzati sono stati:

Mannitolo - Maltitolo - Maltosio - Sorbitolo - Isomalto - Maltotriosio - Inositolo - Lattulosio - Xilitolo

__Tabella 1.__ Riduzione percentuale (%) della proliferazione cellulare di una linea cellulare di epatocarcinoma umano trattata con i singoli componenti citati.

Mannitolo	maltitolo	Maltosio	Sorbitolo	Isomalto	Maltotriosio	Inositolo	Lattulosio	Xilitolo	riduzione crescita cellulare %
2.8	12.9	0.3	0.4	4.7	3.4	0.4	3.2	12.6	24 h
3.7	15.3	0.5	1.2	6.5	4.5	0.7	5.4	25.7	48 h
5.4	21.8	0.6	2.2	10.8	6.7	1.2	6.9	39.6	96 h
Vit. C	Vit. B5	Vit. D	Vit. B9	tartarico	piruvico	citrico	Amilasi	Lattasi	riduzione crescita cellulare %
1.20	0.06	0.02	0,00	2,00	0.7	0,02	0,37	0,42	24 h
3.3	0.08	0.04	0,00	1.8	0.5	0,20	12,00	45,00	48 h
5.4	1,00	0.07	0.03	2.3	1,00	0,50	28,00	60,00	96 h
le concentrazioni sono equiparate ai trattamenti con la formulazione completa									

La fase successiva della sperimentazione è stata effettuata miscelando i componenti che hanno mostrato una spiccata attività antiproliferativa: Maltitolo, Isomalto, Xilitolo, Amilasi e Lattasi .

Dalla ***Tabella 2***, si evince che i 5 componenti miscelati non mostrano un effetto sinergico evidente, infatti i risultati in percentuale di antiproliferazione della linea cellulare tumorale rimangono simili a quelli osservati per la sola Lattasi (45% a 48 ore; 60% a 96 ore). E' invece utile notare che è evidente l'incremento dell'antiproliferazione esercitata dalla miscela a 24 ore. La velocità di antiproliferazione appare infatti incrementata raggiungendo il 38%. Valore non osservato per i tre singoli componenti (Xilitolo, Amilasi e Lattasi). Questo appare il primo dato significativo per ciò che concerne un potenziale effetto sinergico.

__Tabella 2.__ Riduzione percentuale (%) della proliferazione cellulare in presenza della miscela di 5 componenti di Citozym risultati più attivi (__Tabella 1__).

	24 h	48 h	96 h
maltitolo			
Isomalto			
Xilitolo	**38**	**47**	**58**
Amilasi			
Lattasi			

La percentuale di antiproliferazione è stata valutata anche per la miscela dei componenti risultati potenzialmente attivi, ma percentualmente meno attivi dei precedenti.
Dalla ***Tabella 1*** si evince che 4 componenti (Mannitolo, Maltotriosio Lattulosio e Vitamina C), hanno mostrato una percentuale di antiproliferazione inferiore rispetto ai componenti precedentemente analizzati (Maltitolo, isomalto, Xilitolo, Amilasi e Lattasi).
I valori di antiproliferazione sono mostrati in ***Tabella 3***.

__Tabella 3.__ Riduzione percentuale (%) della proliferazione cellulare in presenza della miscela di 4 componenti di CItozym risultati attivi (__Tabella 1__).

Mannitolo			
Maltotriosio	**2.5**	**3.7**	**8.5**
Lattulosio			
Vit. C			

Si deduce dai valori presentati in ***Tabella 3***, che la miscela di questi componenti (Mannitolo, Maltotriosio, Lattulosio e Vitamina C), non presenta alcun effetto sinergico sull'antiproliferazione.
La successiva sperimentazione è stata focalizzata sulla ricerca di sinergia fra i componenti più attivi e quelli meno attivi. Abbiamo aggiunto alla miscela più attiva (Maltitolo, Isomalto, Xilitolo, Amilasi e Lattasi) un componente della serie dei meno attivi. La ***Tabella 4*** illustra l'azione sinergica dei 4 componenti meno attivi (Mannitolo, Maltotriosio, Lattulosio e Vitamina C), presi singolarmente.

Tabella 4. *Riduzione percentuale (%) della proliferazione cellulare in presenza della miscela di 4 componenti di CItozym risultati più attivi, arricchiti di un componente meno attivo.*

	24 h	48 h	96 h		24 h	48 h	96 h
maltitolo				maltitolo			
Isomalto				Isomalto			
Xilitolo	42	70	88	Xilitolo	40	42	62
Amilasi				Amilasi			
Lattasi				Lattasi			
Mannitolo				Maltotriosio			

	24 h	48 h	96 h		24 h	48 h	96 h
maltitolo				maltitolo			
Isomalto				Isomalto			
Xilitolo	45	52	60	Xilitolo	48	65	82
Amilasi				Amilasi			
Lattasi				Lattasi			
Lattulosio				Vit. C			

Un evidente effetto sinergico è stato osservato con l'aggiunta di Vitamina C o di Mannitolo, noti antiossidanti. Come si evince dalla ***Tabella 4*** , il Maltotriosio e il Lattulosio non incrementano l'azione antiproliferativa della miscela: Maltitolo, Isomalto, Xilitolo, Amilasi e Lattasi., mentre sia la Vitamina C e il Mannitolo, incrementano il valore ottenuto con la sola miscela di circa il 20%.

Tabella 5. *Riduzione percentuale (%) della proliferazione cellulare in presenza della miscela di 9 componenti di Citozym.*

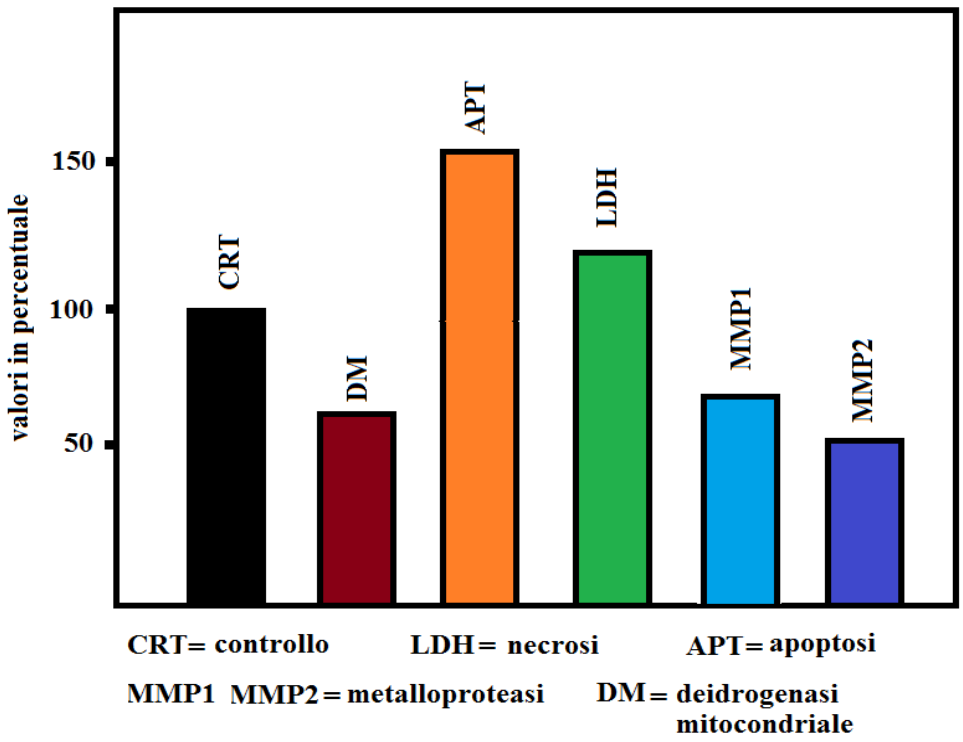
	24 h	48 h	96 h
maltitolo			
Isomalto			
Xilitolo			
Amilasi	52	65	90
Lattasi			
Mannitolo			
Maltotriosio			
Lattulosio			
Vit. C			

La miscela completa di 9 elementi (***Tabella 5***) evidenzia un significativo effetto sinergico (+30%) rispetto al controllo dopo 96 ore di trattamento.

Target del sinergismo

Abbiamo cercato i target del sinergismo esercitato dai 9 componenti citati. Gli elementi cellulari coinvolti in questa azione del **Texidrofolico** sono evidenziati nel grafico di ***Figura 1*.**
Con il controllo non trattato posto a 100, abbiamo elaborato le percentuali di variazione di 5 parametri cellulari coinvolti nella proliferazione e cancerogensi, dopo 96 ore di trattamento con la miscela indicata in ***Tabella 5***.

Figura 1



Deidrogenasi Mitocondriale (DM)

Le deidrogenasi hanno un ruolo fondamentale nei processi metabolici cellulari, processi come la glicolisi, il ciclo di krebs, la fosforilazione ossidativa e la β-ossidazione sono possibili grazie a tali enzimi che catalizzano reazioni specifiche. Dal grafico di ***Figura 1***, si evince che 96 ore di trattamento con la miscela completa presentata in ***Tabella 5***, le attività delle deidrogenasi mitocondriali sono ridotte del 35%. Il dato indica la riduzione dei cicli metabolici cellulari che conducono alla utilizzazione delle sostanze di riserva e quindi alla formazione di ATP.

Apoptosi (APT)

La riduzione della proliferazione osservata nelle condizioni indicate è in parte dovuto all'incremento della morte cellulare (apoptosi) del 58%.

Lattato deidrogenasi (LDH)

La lattato deidrogenasi, liberata nel mezzo di coltura indica la morte cellulare per necrosi.
Nell'esperimento indicato a 96 ore di coltura appare un incremento di LDH di circa il 21%.

Metalloproteasi (MMP1/MMP2)

Le MMP1 e 2 svolgono un ruolo fondamentale nei processi cellulari quali: Proliferazione cellulare Migrazione (adesione/appiattimento) Differenziamento Angiogenesi Apoptosi e Difesa dell'ospite. La riduzione di tali attività enzimatiche (MMP1= 30% ; MMP2= 44%) sono indice di riduzione sia del potere metastatico che invasivo delle cellule di epatocarcinoma umano utilizzate.

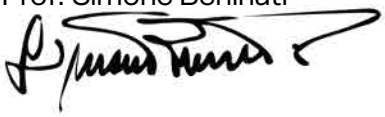
Conclusioni

La sperimentazione presentata ha evidenziato il ruolo chiave del potere antiossidante esercitato da Citozym. Infatti è risultato statisticamente provata l'azione sinergica di due antiossidanti quali l'acido ascorbico e il mannitolo.
La capacità antiproliferativa della miscela a 9 componenti (***Tabella 5***), ha inoltre evidenziato il ruolo chiave svolto da queste molecole, **in assenza di zuccheri.**
L'osservazione di molti, che il Texidrofolico ha nella sua composizione più del 90% di zuccheri, trova risposta nella doppia azione di questo integratore: stimolatore della attività cellulare nella produzione di energia, prima con la glicolisi e dopo con il ciclo mitocondriale e l'altra di aumento del potere antiossidante di elementi dannosi per la cellula. Il risultato di tale connubio è fornire energia alla cellula e, contemporaneamente, ridurre gli effetti deleteri dello stress ossidativo.
Abbiamo sempre affermato che il Texidrofolico non è un farmaco, ma presenta dei co-effettori, con un ruolo protettivo, nei confronti dell'azione metabolica degli enzimi coinvolti durante il percorso delle sostanze attive (enzimi) nel corpo, prima che raggiungano il loro sito di azione.
Quindi le sostanze attive (enzimi) non possono essere degradate e manterranno tutta la loro attività svolta nella cellula; per due motivi: il primo per raggiungere l'energia di attivazione necessaria alla funzione enzimatica e l'altro per evitare di danneggiare il corredo proteico enzimatico.
Stiamo attualmente indagando i siti di azione dei vari componenti in cellule normali e tumorali per cercare un eventuale specificità d'azione.

Roma, 08/10/2018

I responsabili scientifici,

Prof. Simone Beninati



Dott. Francesco Antonelli





Scientific & Academic Publishing

Home Journals Books Resources Publishing Services Manuscript Submission Join Us About Us Contact Us

Paper Information
· Paper Submission

Journal Information
· About This Journal
· Editorial Board
· Current Issue
· Archive
· Author Guidelines
· Contact Us

International Journal of Tumor Therapy
p-ISSN: 2163-2189 e-ISSN: 2163-2197
2019; 8(1): 10-15
doi:10.5923/j.ijtt.20190801.03

Abstract
Reference
Full-Text PDF
Full-text HTML

Open Access

Effect of a Novel Dietary Supplement on Cancer Cells Metabolism

Antonelli Francesco[1], Ferorelli Pasquale[1], De Martino Angelo[1], Borromeo Ilaria[1], Shevchenko Anna[2], Beninati Simone[1]

[1]Department of Biology, University of Tor Vergata, Rome, Italy

[2]Department of Pharmacology, Kabardine University, Russia

Correspondence to: Beninati Simone, Department of Biology, University of Tor Vergata, Rome, Italy.
Email: beninati@bio.uniroma2.it

Copyright © 2019 The Author(s). Published by Scientific & Academic Publishing.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

Abstract One area of research currently garnering significant attention is the in-depth study of cancer cell metabolism. The purpose of this research is not exclusively to discover new anticancer therapies, but rather to improve the quality of life of the patient. Many cancer patients suffer from a muscle wasting syndrome called cachexia. Cancer related cachexia impairs quality of life and response to therapy, which increases morbidity and mortality among cancer patients. The data presented in this report were collected to address disorders caused by therapies aimed at reducing tumor growth. Carbohydrate metabolism is the major pathway in the cell providing energy and building blocks for macromolecule biosynthesis. Glucose metabolism in cancerous cells is remarkably different from that in their normal counterparts. The purpose of this research was to investigate the effects on energy metabolism in normal and neoplastic cells of the various components of the dietary supplement **Texidrofolico (TXF),** which act on their cellular enzymatic complexes. Treatment of HepG2 tumor cells with TXF reduces glucose consumption, and slows reduction of pyruvate to lactate, following indirect inhibition of lactate dehydrogenase (LDH) by blocking regeneration of NAD+ from NADH. These activities inhibit glycolysis, with consequent reduction in energy yield, evidenced by an increased ADP/ATP ratio. By contrast, in normal MEF cells treated with TXF, the ADP/ATP ratio was observed to be lower than in untreated control cells, showing increased energy relative to untreated normal cells. The observed effects seem to be due to the presence of two active components in TXF: folic acid, and pyruvate. Calciferol, which exerts less influence on glucose consumption, instead shows some inhibition of LDH reductase activity.

Keywords Dietary supplements, HepG2 cell, MEF cell, Folic acid, Pyruvate, Calciferol

1. Introduction

The quality of life of people with cancer is still neglected. Clinicians rarely face this and few patients talk to their doctor. In most studies, quality of life is excluded from the criteria for assessing the effectiveness of a treatment. Exhaustion, nervousness, difficulty falling asleep, mild dysentery, lack of appetite and cachexia, are serious and very frequent annoyances among cancer patients, which can worsen the quality of life. In Italy currently, almost 4 million patients live after a cancer diagnosis with disorders that, underestimated may compromise adherence to treatments and the effectiveness of treatments. It is important to evaluate the factors involved in the non-compliance with the indicated therapy, including the appearance of side effects. Currently, in several neoplasms, survival increases significantly and the side effects decrease and change. Suffice it to say that survival after five years reaches 91% in prostate cancer and 87% in breast cancer. This new reality requires the need to investigate, analyze and understand the new needs of patients, so that they can improve their quality of life. In particular, the conditions must be set so that on the one hand the patient, his family members and caregivers express the new needs. The project "*Search for new dietary supplements to improve the quality of life of cancer patients*", began in 2016, in the laboratory of Experimental Oncology of the University of Tor Vergata, Dept. of Biology, with the realization of four surveys conducted to take a photo on awareness on the subject involved (patients, oncologists,

* Corresponding author:
beninati@bio.uniroma2.it (Beninati Simone)
Published online at http://journal.sapub.org/ijtt
Copyright © 2019 The Author(s). Published by Scientific & Academic Publishing
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

family doctors and pharmacists). The oncologist's goal is not only to increase survival, but also to seek the clinical benefit for the patient who combines stability of disease and quality of life that is good or at least acceptable. If the therapies prolong the time in which the disease is controlled / stable we could say that the disease becomes chronic and in truth (at least for some tumor diseases) more and more sick people cohabit for years with the tumor, more or less symptomatic, continuing to play a social life and relationships, often not very different from the one they had before the pathology. In conclusion, the impact on a patient's quality of life must be a fundamental parameter for establishing the value of a new anti-cancer drug. The determination of clinical efficacy is no longer enough. This is an inevitable process in relation to the provisions of the European Health Technology Assessment (HTA) proposal, presented in January 2018 in Brussels. In order to contribute to the achievement of a protocol aimed at improving the quality of life of the cancer patient, our research group has investigated a series of elements contained in a commercial food supplement, called **"Texidrofolico" (TXF),** highlighting the potential influence of these on the cellular metabolism. A subsequent study will focus on the administration of this supplement to cancer patients, in order to be able to observe any positive effects on some of the most common disorders due to the pathology in place and to chemotherapy (work in progress).

Long-term investigation and extensive efforts using genomics, proteomics or metabolomics analysis identified thousands of mutations in a single tumor. However, we cannot succeed at curing cancer by targeting mutations as the cause of cancer. Therefore, as an alternate therapeutic approach from classical oncology study, stimulation of the inherent ability of the immune system to attack tumor cells was welcome as a new principle in cancer therapy. Targeting the cancer energy metabolism may be a cancer-specific therapy for all kinds of cancer because normal cells do not rely on cancer energy metabolism under normal conditions.

Enzymes are one of the main components of the human organism, they are catalysts of biological processes and are, therefore, responsible for vital processes in both animals and plants [1]. Changes in cell function are achieved by altering the activity of these small protein agents, either through changes in gene expression, protein degradation or post-translational modifications [2]. The numerous molecular processes in cells yield complex cellular structures, movements and regulatory decisions. We know most of the molecules that underlie these structures, behaviors and decisions, but we often do not know how all these molecules interact and function together [3].

The purpose of this research was to investigate the role of the various components of a food supplement (TXF) in intervening in the energy metabolism of normal and neoplastic cells, by acting on the cellular enzymatic complex, to reduce the side effects of anticancer therapies, improving the quality of life of cancer patients.

2. Experimental Protocol

2.1. Cell Treatments

Two cell lines were used as the *in vitro* model. A primary culture of human fibrocytes (Immortalized Mouse Embryonic Fibroblast - MEF) and a tumor cell line of human hepatocarcinoma (HepG2). On the basis of some previous experiments, were also evaluated some particularly active components of the formulation of TXF, such as: calciferol (vitamin D), folic acid and pyruvic acid. **TXF was obtained** from **CITOZEATEC, S.r.l. (Peschiera Borromeo, Milano,** Italy). The main components of TXF are as follows (units/100 g): 500 mg of vitamin C, 56 mg of vitamin B5, 56 µg of vitamin D, 3.3 mg of vitamin B9, 3.3 mg folic acid, 222 mg of pyruvic acid, 120 mg of citric acid and 250 mg of tartaric acid, amylase and lactase.

2.2. Dosage of Glucose Consumption

Glucose consumption was evaluated in both cell lines in 6-well plates. Glucose consumption was determined using a glucose-oxidase test kit (GAGO-20, Sigma Aldrich, MO, USA). After the TXF treatment (2 mg/mL), at different times (3, 6, 12, 24 and 48 hours), 50 µl of culture medium was collected from untreated and treated groups.

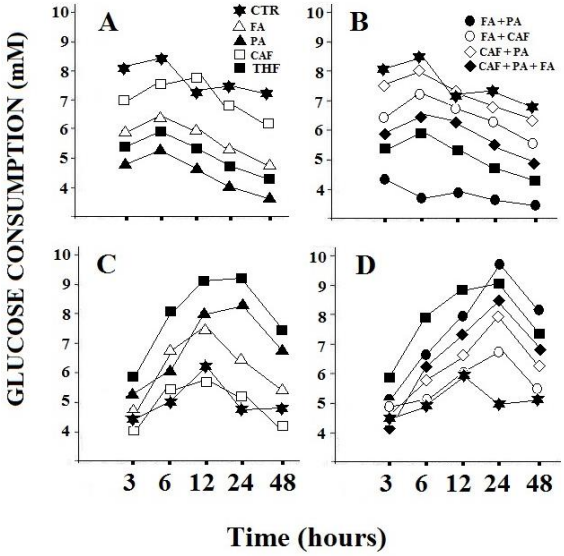


Figure 1. Glucose consumption in HepG2 cells (A and B) and in MEF cells (C and D). Treatment with the individual components, folic acid, pyruvate and calciferol (A and C) and their combination (B and D).**CTR**: control; **FA**:folic acid; **PA**: pyruvate; **CAF**: calciferol. The observed data showed variations of less than 15%

Cells were trypsinized, for cell number determination, using the Trypan blue exclusion test and the number of living cells was counted using a hemocytometer. The TXF-treated cells were collected and sonicated (30 s). The cell suspensions were all filtered and diluted 10 times with MilliQ water. Absorbance at λ560 nm was converted to glucose concentration, using a 5 µg/ml glucose standard from the kit as a single standard. Glucose consumption was

calculated by subtracting the control value from the average values of the treated products. Glucose consumption per cell was calculated from the number of cells determined as indicated above.

2.3. [ADP] / [ATP] Ratio Measurement

The ADP/ATP ratio, when measured properly, provides a snapshot into the bio-energetic status of a cell or tissue. It has been successfully used to assess the metabolic state of a variety of tissues under various conditions [4].

The cells were grown in 96-well plates with a transparent bottom. The [ADP] / [ATP] ratio of both cell lines was determined immediately after the incubation period (3, 6, 12, 24 and 48 hours) using an assay kit (MAK135; Sigma Aldrich, USA) according to the manufacturer's instructions. Luminescence levels of the luciferase-mediated reaction were measured using a plate illuminometer (PerkinElmer 2030 multi-reader, MA, USA). The ratio [ADP] / [ATP] was calculated from the luminescence values using a formula provided by the kit manufacturer.

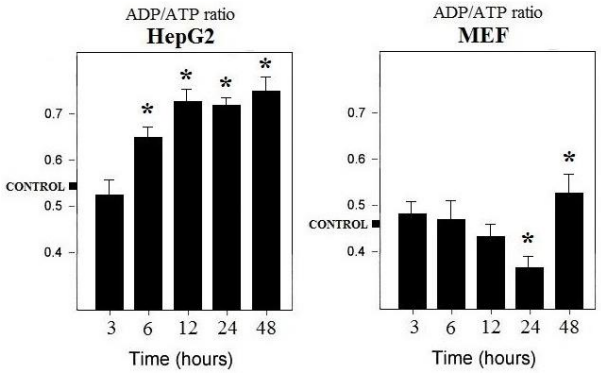


Figure 2. ADP/ATP ratio in fully formulated TXF-treated HepG2 and MEF cells. The value represents the mean of three determinations with ± SD, *p<0.05

2.4. Assay of Lactate Content

The concentration of lactate, the final product of anaerobic glycolysis, was determined using a lactate colorimetric assay kit (Abcam, MA, USA). The cells were grown in 6-well plates for 3, 6, 12, 24 and 48 hours with and without TXF (2 mg/mL). The cells were collected and then harvested and deproteinized according to the manufacturer's protocol. The optical density was measured at λ450 nm and a standard curve graph (nmol/well vs. OD λ450 nm) was generated using serial dilutions of lactate. Lactate concentrations were calculated using the formula provided by the kit manufacturer.

2.5. Cell cycle Assay and Apoptosis

Cells were grown in 6-well plates and treated with 2 mg/mL of TXF or 0.5 mg/mL of calciferol, folic acid and pyruvic acid as individual components or in various combinations of them. After culture for 3, 6, 12, 24 and 48 hours, the cells were collected and subjected to cell cycle analysis by staining with propidium iodide as previously reported [5]. Data were obtained by flow cytometry using Accrui (BD Biosciences, NJ, USA) and analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc, OR, USA).

2.6. LDH Assay

The enzyme activity of LDH was evaluated with the Vanderlinde method [6]. In brief, HepG2 hepatocytes and MEF cell were cultured in 96-well plates. After treatment for 3, 6, 12, 24 and 48 hours in DMEM supplemented with and without TXF (2 mg/mL), LDH was measured in medium and cell extracts according to the manufacturer's instruction.

2.7. Statistical Analysis

All the above tests were performed in triplicate and repeated at least three times. Statistical significance was defined as p-value below 0.05 and determined by t-test and two-way ANOVA test for the rest of the GraphPad Prism tests (v7.03, Graphpad Software Inc., CA, USA); error bars indicated standard deviation.

3. Results and Discussion

Several pathways affected by TXF, have been validated, and used as a focal point for further investigation, to identify specific molecular targets mediating the enzymatic metabolism of normal and cancer cells.

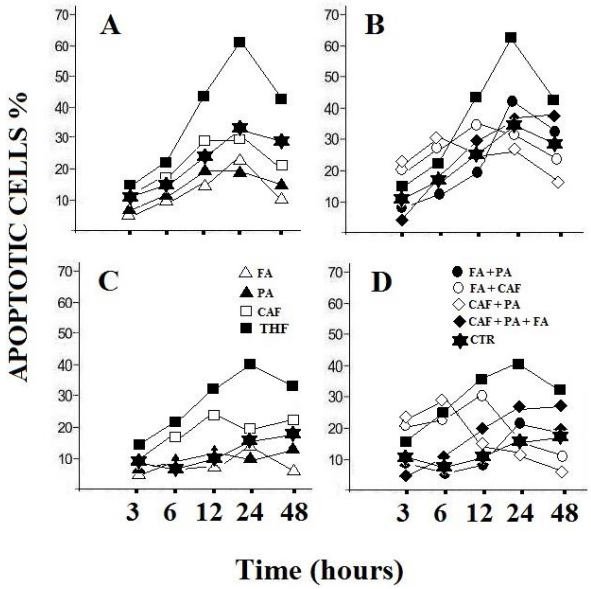


Figure 3. Apoptosis in HepG2 cells (**A** and **B**) and in MEF cells (**C** and **D**). Treatment with the individual components, folic acid, pyruvate and calciferol (**A** and **C**) and their combination (**B** and **D**). The value represents the mean of three determinations with variations of less than 10%. **CTR**: control; **FA**: folic acid; **PA**: pyruvate; **CAF**: calciferol. The observed data showed variations of less than 15%

3.1. Suppression of energy metabolism by TXF on cancer cells.

A preliminary screening was carried out to highlight the

potential active components of TXF (data not shown). The results obtained allowed us to identify three components of TXF, particularly active on cellular metabolism: folic acid, pyruvate and calciferol.

From Figure 1 it is possible to observe that the treatment of HepG2 cells with TXF reduces the consumption of glucose, with consequent inhibition of the energy metabolism of the cancer cell. In fact, the obtained data, seem to suggest that HepG2 cells, in the presence of pyruvic acid and folic acid, two main components of TXF, use lower amounts of glucose than the control (Figure 1A and B), reducing energy yield as confirmed by a higher ratio [ADP] / [ATP] (Figure 2). On the contrary, the TXF-treated MEF cells significantly increased the glucose consumption (over 55%) likely due to the presence of pyruvic acid and folic acid in the TXF formulation (Figure 1C and D). Furthermore, in normal MEF cells, the [ADP] / [ATP] ratio is lower, thus showing an increase in energy metabolism (Figure 2).

Intracellular ADP and ATP levels fluctuate rapidly because these high-energy phosphate molecules are rapidly produced and consumed in many intracellular biochemical reactions. It is widely known that viable cells turn over entire ATP stores on the order of minutes, and that dying cells are incapable of replenishing their ATP stores when depleted [7]. The 40% reduction in glucose consumption and higher lactate levels (Figure 4), observed in cancer cells suggests the inhibition of the Krebs cycle or oxidative phosphorylation. In this context among the various components of TXF, folic acid and pyruvate, appeared the most active factors (Figure 1A and B). In contrast, calciferol did not show a significant effect on glucose consumption. Again, these observations, in combination with the other results, supports a decrease in metabolic flow through the Krebs cycle as the likely cause of suppression of the tumor cell's energy metabolism.

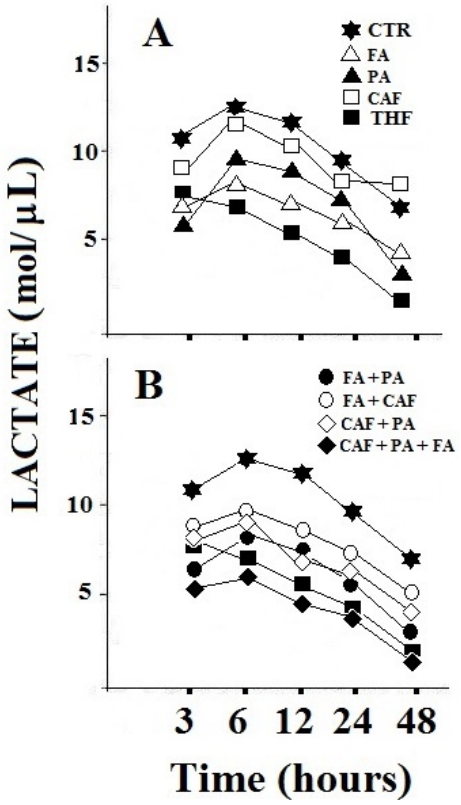


Figure 4. Lactate levels in HepG2 cells. Treatment with the individual components, folic acid, pyruvate and calciferol (**A**) and their combination (**B**). The value represents the mean of three determinations with variations of less than 10%. **CTR**: control; **FA**: folic acid; **PA**: pyruvate; **CAF**: calciferol. The observed data showed variations of less than 15%

Glucose and glycolysis are important for the pro-inflammatory functions of many immune cells and glucose depletion in pathological microenvironments is associated with defective immune responses [8]. This information, reveals a mechanism by which T cells regulate the microenvironment of denditric cells (DC) to control DC-induced T cell responses and indicate that glucose is an important signal to model immune responses. One of the characteristics of TXF is its high carbohydrate content (98%). It would seem a nonsense to provide glucides to cancer cells, especially since they are metabolized mostly into glucose. If we consider that the intake of carbohydrates stimulates the immune system of the body carrying a tumor and that this system could counteract the growth of the neoplasm, it would seem plausible to accept the high concentration of TXF carbohydrates. Particularly if this condition is accompanied by the results presented in this study. As is well known, during an immune response the cells of our body, involved in the action of defense become particularly active, and need energy that they take from the degradation of glucose, to properly perform their functions [9]. It is no coincidence that when these cells need glucose but cannot find it, such as in some tumors, they lose their natural function. Therefore, there is no doubt that a glucose intake stimulates the immune system, but it is equally

important to consider that it also provides energy for cancer cells. In light of this evidence, the observed reduction made by the TXF on the consumption of glucose in the cancer cell could represent the way by which the stimulatory effect on the immune system could be enhanced by reducing the use of carbohydrates by the tumor cell.

3.2. Perturbation of the Cell Cycle by Treatment with TXF

Figure 3 shows the induction of apoptosis in the HepG2 cell line by the three active components alone (Figure 3a) or in combination (Figure 3b) with respect to TXF in its complete formulation. From the results it can be deduced that TXF can influence the cell cycle, by altering the proportions of apoptotic cells in tumor cell cultures treated at different times compared to controls (Figure 3 a).

Folic acid, the most abundant compound present in TXF, has been previously shown to disrupt a number of signaling pathways and alter/stop the cell cycle in a variety of cancer cells [10]. This observation was confirmed in HepG2 cells. The present results allow a direct comparison with TXF because our experiments were conducted using equivalent concentrations of folic acid, calciferol and pyruvic acid similar of those present in TXF.

Folic acid, calciferol and pyruvic acid do not appear to be as effective in influencing the cell cycle as the complete product. This indicates that these three components should interact with other compounds present in TXF to have a greater effect on the cell cycle. The normal cell line (MEF) is not affected by TXF treatment or by the three components at different times (Figure 3 c, d).

In conclusion, it is possible to deduce that TXF-treated HepG2 cells drastically reduce the consumption of glucose which lowers the available ATP levels. This condition is sufficient to trigger the programmed cell death of tumor cells [11], as can be deduced from Figure 3.

3.3. Metabolic Effects of TXF on Normal Cells

In an ongoing investigation, in patients with lung cancer, we observed that anorexia, weakness, cough, dyspnea, hemoptysis and pain, typical symptoms of chemotherapy, are reduced in the combined treatment with Pemetrexed-TXF compared to that with Pemetrexed alone (work in progress). On the basis of the observations presented in this report, it is feasible to understand how the complete formulation of TXF can act positively on the symptoms typical of cancer patients undergoing chemotherapy. It is interesting to note that in normal MEF cells, TXF has the opposite effect on the ratio [ADP] / [ATP] compared to that observed on cancer cells, indicating that the complete formulation of this supplement, in normal cells, can increase the energy metabolism and increase the energy load of the cell. This is particularly interesting considering the observations made on cancer patients treated with TXF. In these patients not only was the decrease in the negative effects of cancer cachexia observed, but also an increase in vital signs with a consequent better quality of life (work in progress).

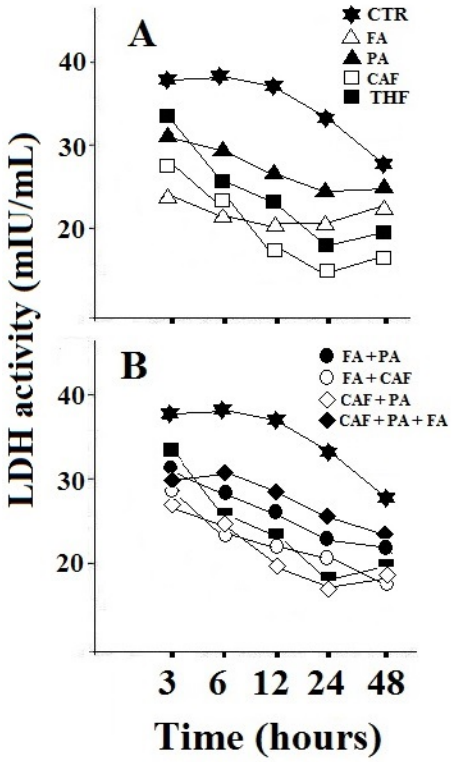


Figure 5. LDH activity in HepG2 cells. Treatment with the individual components, folic acid, pyruvate and calciferol (**A**) and their combination (**B**). The value represents the mean of three determinations with variations of less than 10%. **CTR**: control; **FA**: folic acid; **PA**: pyruvate; **CAF**: calciferol. The observed data showed variations of less than 15%

We focused our study on the search for the potential synergistic effect, deriving from the action of the various constituents of TXF, which act, not on a single target but on different targets and cooperate in an agonist-synergistic pathway to provoke a powerful pharmacological activity.

The target concept may includes enzymes, substrates, proteins and metabolites, receptors, ion channels, transport proteins, DNA / RNA, ribosomes, physico-chemical mechanisms and signal cascades. The advantage of this multiplicity of active constituents and their complementary actions, gives TXF a delicate, deep and lasting action, compared to a drug derived from chemical synthesis, which generally consists of a single active ingredient, which will have a unique action, focused and incisive.

Some components of TXF have no pharmacological effects, but they improve the bioavailability of other active compounds, thus allowing the active compounds to be much more effective compared to the action they would manifest themselves. These constituents, which work in synergy with other inactive molecules, are called "co-effectors". The role of some of these co-effectors can, for example, increase the solubility in water, of other active constituents, or help their passage through the cell membranes at the level of the intestinal wall, thus facilitating their diffusion into the blood.

Other co-effectors may also have a protective role towards the metabolic action of the enzymes involved during the pathway of the active substances in the body, before they reach their site of action. Therefore the active substances (enzymes) cannot be degraded and will keep all their activity.

Thanks to the multitude of constituents, the corollary of conjugated and variable synergistic effects, the versatility of complementary activities, the low-dose efficacy and the concerted and harmonious action of other constituents that accompany them, TXF will act in a gentle, deep and lasting and could have a regulatory action in addition to its own symptomatic action.

4. Conclusions

The experimental observations, although preliminary, would suggest that the burst of additional energy deriving from the treatment with TXF, increases the performance of normal cells in the body, improving the quality of life of the patient. On the contrary, the reduction of energy generated by TXF in cancer cells may slows down the disease progression. These findings may explain the positive effects observed in patients with lung cancer. Furthermore, it is not difficult to suppose that treatment with TXF may be involved in activating the patient's immune system due to the presence of additional glucose, which is not used by cancer cells. Obviously all these assertions will have to be investigated in the near future.

Therefore, in conclusion, we could deduce that the food supplement tested could be an excellent adjunct in the treatment of cancer patients, obviously not as an antitumor drug, but as useful to improve the quality of life by reducing the adverse symptoms of chemotherapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to A.R.S.S. Italy, for financial support for studying the possibility of improving the quality of life of cancer patients.

REFERENCES

[1] A. Lodish, J. Darnel and D. Baltimore, ”Molecular Cell Biolo gy” Scientific American Books. 1986.

[2] M.Yan, Z. Zhang, J. Zhou, W. Li, C. Zhang, S. Fan and Z.Yang. 2019, DFT calculation and NMR data of novel aryloxymaleimides and the intermediates and transition states in the reaction. Data Brief. 25,104110.

[3] Lentini A, Tabolacci C, Melino S, Provenzano B, Beninati S. 2010, Post-translational modification of glutamine and lysine residues of HIV-1 aspartyl protease by transglutaminase increases its catalytic activity. Biochem Biophys Res Commun. 393(3), 546-550.

[4] Suszynski TM, Wildey GM, Falde EJ, Cline GW, Maynard KS, Ko N, Sotiris J, Naji A, Hering BJ, Papas KK.2008, The ATP/DNA ratio is a better indicator of islet cell viability than the ADP/ATP ratio Transplant Proc. 40(2), 346-350.

[5] Nescerecka A, Hammes F, Juhna T.2016, A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining. J Microbiol Methods.131,172-180.

[6] Vanderlinde R.E. 1985, Measurement of Total Lactate Dehydrogenase Activity, Annals of Clinical and laboratory Science. 15(1) 12-16.

[7] Wang Y, Martins I, Ma Y, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G.2013, Autophagy-dependent ATP release from dying cells via lysosomal exocytosis.Autophagy. 9(10), 1624-1625.

[8] Lawless SJ, Kedia-Mehta N, Walls JF, McGarrigle R, Convery O, Sinclair LV, Navarro MN, Murray J, Finlay DK. 2017. Glucose represses dendritic cell-induced T cell responses. Nat Commun. 8:15620.

[9] Kaul D, Sharma S. 2015, High glucose-induced human cellular immune response is governed by miR-2909 RNomics. Blood Cells Mol Dis. 54(4):342-347.

[10] Cianciulli A, Salvatore R, Porro C, Trotta T, Panaro MA.2016, Folic Acid Is Able to Polarize the Inflammatory Response in LPS Activated Microglia by Regulating Multiple Signaling Pathways. Mediators Inflamm. 2016: 5240127.

[11] Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y.1997, Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. Cancer Res. 57(10):1835-1840.

9

COVID 19

9.1 COVID 19 - Ricerca Uniroma 2

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

LABORATORIO DI BIOLOGIA CELLULARE E ONCOLOGIA SPERIMENTALE

Direttore responsabile: *Prof. Simone Beninati*
Primo assistente alla ricerca: *Dott. Francesco Antonelli*

PROGETTO COVID 19, ITALIA

Introduzione

I coronavirus sono di grandi dimensioni con RNA a singolo filamento, che infettano l'uomo, ma anche una vasta gamma di animali. I coronavirus sono stati descritti per la prima volta nel 1966 da Tyrell e Bynoe, che hanno coltivato il virus da pazienti con raffreddori comuni. Sulla base della loro morfologia, sono virioni sferici, con un guscio del nucleo e proiezioni di superficie simile a una corona solare, sono stati denominati per questo, coronavirus.
Esistono quattro sottofamiglie: alfa, beta, gamma e delta-coronavirus. Mentre gli alfa e i betacoronavirus sembrano provenire dai mammiferi, in particolare dai pipistrelli, i gamma e i delta-coronavirus provengono da suini e uccelli. La dimensione del genoma varia tra 26 kb e 32 kb. Tra i sette sottotipi di coronavirus che possono infettare l'uomo, i beta-coronavirus possono causare malattie gravi e mortali, mentre gli alfa-coronavirus causano infezioni asintomatiche o leggermente sintomatiche. La SARS-CoV-2 appartiene alla linea B dei beta-coronavirus ed è strettamente correlata al virus della SARS-CoV. I quattro principali geni strutturali codificano la proteina nucleocapside (N), la proteina spike (S), una piccola proteina di membrana (SM) e la glicoproteina di membrana (M) con un'ulteriore glicoproteina di membrana (HE) presente nei beta-coronavirus dell'HCoV-OC43 e HKU1. La SARS-CoV-2 è identica al 96% a livello del genoma intero a un coronavirus del pipistrello.
Come altri virus, la SARS-CoV-2 infetta le cellule epiteliali alveolari polmonari utilizzando l'endocitosi mediata dal recettore attraverso l'enzima di conversione dell'angiotensina II (ACE2) come recettore di ingresso. Si presume quindi che i farmaci associati alla proteina chinasi 1 associata all'AP2 (AAK1) che perturba queste proteine, possano inibire l'ingresso virale nelle cellule bersaglio. L'enzima convertitore dell'angiotensina (*Angiotensin-converting enzyme*), è un enzima appartenente alla famiglia delle esopeptidasi, e in particolare delle carbossipeptidasi. È una glicoproteina generalmente di membrana, localizzata sull'endotelio dei capillari polmonari, e catalizza specialmente il clivaggio del decapeptide angiotensina I nell'ottapeptide angiotensina II, grazie al taglio degli ultimi due amminoacidi C-terminali. L'angiotensina II è l'effettore più efficace ad azione ipertensiva del sistema renina-angiotensina-aldosterone. Questo sistema controlla il volume dei liquidi extracellulari e la vasocostrizione delle arterie.
La mancata regolazione dell'enzima porta ad un alto tenore di vasocostrizione responsabile dell'ipertensione.
Il coronavirus, SARS-CoV-2, per entrare nelle cellule bersaglio, usa proprio il legame con l'enzima ACE2. Studi condotti su cavie hanno riportato che i farmaci ACE inibitori o bloccanti il recettore dell'angiotensina 2, come lisinopril e il losartan, possono aumentare significativamente l'espressione di RNA messaggero (e quindi probabilmente anche la quantità di proteina stessa) dell'ACE2 cardiaco. Se questo stesso meccanismo dovesse verificarsi anche negli uomini, una maggiore espressione di ACE2, "potrebbe accelerare ulteriormente l'assorbimento del virus nelle cellule e la colonizzazione del tessuto polmonare dell'ospite".

Stato nutrizionale del paziente COVID-19

La nutrizione ha un ruolo importante nei pazienti COVID-19. In primo luogo, l'infezione da COVID-19 e la malnutrizione tendono a coesistere. Con il progredire della malattia, molti pazienti tendono ad essere denutriti. Alcuni farmaci anti-virali portano anche a malattie metaboliche. In secondo luogo, tra i pazienti, lo scarso stato nutrizionale e le carenze di micronutrienti peggiorano la malattia e aumentano il rischio di fallimento del trattamento terapeutico fino alla morte.

Prima dell'avvento dell'attuale pandemia, gli studi hanno dimostrato che i pazienti infettati da virus, nutriti con diete di qualità superiore e un migliore stato nutrizionale, tendevano a vivere più a lungo e avevano meno complicazioni. Si riduceva la probabilità di divenire anemici e presentavano una conta di cellule CD4 più elevata. Diversi studi randomizzati eseguiti in Africa e in Asia, hanno anche dimostrato che l'uso di integratori multivitaminici ha ridotto la mortalità, rallentando notevolmente la progressione dei danni relativi all'infezione virale. Negli Stati Uniti, l'assunzione di vitamina D, Acido folico, Vitamina A, Vitamina C, Vitamina E, Selenio e Zinco è stata associata in modo simile alla riduzione della progressione della malattia e della mortalità.

Pertanto, una dieta di buona qualità e un'integrazione multivitaminica sono probabilmente utili per ridurre il rischio di infezione da COVID-19. Sappiamo da tempo che l'alimentazione è strettamente legata all'immunità, sia per quanto concerne il rischio e la gravità delle infezioni. Le infezioni croniche o acute, portano a disturbi nutrizionali o peggiorano lo stato nutrizionale delle persone colpite. Pertanto, è imperativo prestare attenzione alla dieta e allo stato nutrizionale durante la pandemia COVID-19 in corso.

Inoltre, il decorso clinico della malattia COVID-19 tende ad essere più grave tra gli individui più anziani e tra le persone con condizioni croniche, come il diabete, l'ipertensione e il cancro, che sono in parte correlati alla nutrizione. Anche se i dati non sono ancora disponibili, le infezioni da COVID-19, in individui in assenza di sintomi, possono anche essere associate a esiti più gravi, e una nutrizione ottimale gioca un ruolo importante nel mantenimento di tale situazione tra i pazienti con tali caratteristiche. Infatti, consumare diete di buona qualità è sempre auspicabile, e questo è particolarmente importante durante la pandemia COVID-19. Una dieta ottimale dovrà fornire quantità adeguate di macronutrienti e minerali essenziali e soprattutto vitamine. La presenza di infezione da COVID-19 comporta una perdita di calorie che conduce alla perdita di peso involontaria è significativa.

Una quantità adeguata di minerali e vitamine fornite da una dieta sana, aiuta a garantire un numero sufficiente di cellule immunitarie e anticorpi, che sono importanti come risposta alle infezioni.

Lo zinco è un componente di molti enzimi e fattori di trascrizione nelle cellule di tutto il corpo, e livelli di zinco inadeguati limitano la capacità dell'individuo di una risposta immunitaria adeguata alle infezioni. Molteplici meta-analisi e analisi in pool di studi randomizzati controllati (RCT) hanno dimostrato che l'integrazione di zinco per via orale riduce il tasso di incidenza delle infezioni respiratorie acute del 35%, riduce la durata dei sintomi simil-influenzali di circa 2 giorni e migliora il tasso di recupero. Gli studi sono stati condotti negli Stati Uniti e in diversi paesi a basso e medio reddito come l'India, il Sudafrica e il Perù. La dose di zinco in questi studi variava da 20 mg/settimana a 92 mg/giorno.

La vitamina C è un cofattore per molti enzimi. Migliora la funzione di molti enzimi in tutto il corpo, mantenendo i loro ioni metallici nella forma ridotta. Agisce anche come antiossidante, limitando l'infiammazione e i danni ai tessuti associati alle risposte immunitarie. L'integrazione di vitamina C riduce significativamente l'incidenza delle infezioni delle vie respiratorie.

Diversi studi clinici dimostrano che l'integrazione di **vitamina D** riduce le probabilità di sviluppare infezioni acute delle vie respiratorie da virus. Questi studi hanno incluso sia l'influenza stagionale che la pandemia influenzale causata dal virus H1N1 nel 2009 (influenza suina).

L'effetto benefico dell'integrazione è stato osservato in pazienti di tutte le età e in individui con malattie croniche preesistenti. Tra coloro che erano stati infettati, i sintomi dell'influenza suina erano minori e il recupero più precoce se avevano ricevuto dosi di vitamina D superiori a 1.000 UI. Nelle polmoniti da infezioni virali in genere come nella SARS COV lo stress ossidativo gioca un ruolo importante.

L'utilizzo di antiossidanti attivi e non tossici come ad es. la **N-acetilcisteina (NAC),** precursore del glutatione, nella terapia antivirale e cortisonica della SARS è sicuramente auspicabile. Alcuni risultati ottenuti in alcuni studi clinici sperimentali hanno dimostrato che la NAC svolge un positivo effetto terapeutico e preventivo sulle infezioni da virus influenzale.

Tali considerazioni permettono di prospettare l'impiego degli antiossidanti anche su altre infezioni virali come il COVID-19, nelle quali lo "stress ossidativo" costituisce presumibilmente un importante fattore-patogenetico.

Razionale del progetto COVID-19

Il fine del progetto è quello di verificare gli aspetti positivi della somministrazione dell'integratore Citexivir in pazienti infettati da COVID-19, asintomatici e sintomatici.

In particolare la formulazione dell'integratore, oggetto di tale progetto, dovrebbe sia migliorare lo stato nutrizionale dei pazienti, che ridurre la sintomatologia e rallentare la progressione.

Diversi parametri clinici saranno controllati, durante i 120 giorni di trattamento in accordo con il protocollo In particolare i seguenti controlli saranno eseguiti:

- raccolta dei dati anamnestici
- tampone rino-faringeo al fine di selezionare esclusivamente volontari infettati da COVID-19
- saturazione dell'ossigeno (al fine di escludere pazienti che richiederebbero la ventilazione polmonare assistita).
- analisi cliniche dei parametri biochimici (relativi all'infezione)
- controllo dello stato nutrizionale del paziente
- radiografie e tomografie computerizzata del torace
- assistenza domiciliare
- Nel nostro studio sarà fondamentale mettere in correlazione l'aumentata produzione di ROS, e le potenziali difese ematiche antiossidanti, ottenendo una valutazione dello stato redox del pazienti con sintomatologia riconducibile al COVID 19, sottoposti a prelievi capillari di 20 microlitri, con valutazione in parallelo e sullo stesso prelievo, sarà valutata la barriera ematica antiossidante BAP TEST (antiossidanti) come gruppi tiolici (–SH), Vitamina E Vitamina C e Acido Urico che costituiscono una componente rilevante con attività antiossidante endogena.

Selezione dei volontari (fase di inserimento nel trial)

I 60 volontari che parteciperanno al progetto dovranno essere esaminati secondo i test diagnostici attualmente in uso in clinica. l'OMS ha pubblicato un protocollo riguardante il test diagnostico per SARS-CoV-2, sviluppato da una squadra di virologi dell'Ospedale Universitario della Charité in Germania. Per selezionare i volontari adatti per il progetto e per escludere quelli che necessitano di ventilazione polmonare (non inseribili), sarà utilizzata la radiografia o tomografia computerizzata del torace per evidenziare segni riconducibili alla polmonite.

La diagnosi viene effettuata grazie all'esecuzione di un esame di reazione a catena della polimerasi inversa in tempo reale (rRT-PCR) su campioni di espettorato o di sangue prelevati dal paziente.
Il test, quindi, utilizza la reazione a catena della polimerasi inversa in tempo reale (rRT-PCR).

I risultati sono generalmente disponibili entro poche ore o, al massimo, giorni. L'inserimento nel trial sarà effettuato istruendo i pazienti alla metodica di somministrazione di ***Citexivir*** secondo il protocollo terapeutico allegato. I volontari non saranno ospedalizzati, ma seguiranno la terapia in ambito domestico secondo le regole della quarantena.
Personale sanitario specializzato, munito di tutti i dispositivi medici di sicurezza, curerà la raccolta dei parametri relativi ai risultati e dei prelievi biologici previsti.
I volontari definiti "sintomatici", non necessitando della ventilazione polmonare assistita potranno trascorrere il periodo di quarantena in ambito domestico, rispettando le norme di prevenzione necessarie per gli altri componenti della famiglia.
Ogni eventuale segnalazione di peggioramento, dello stato di salute del paziente, comporterà l'immediata ospedalizzazione ed esclusione dal progetto. I volontari definiti "asintomatici" potranno trascorrere la quarantena in ambito domestico.

Gruppo A
30 volontari infettati dal COVID-19 (controllati tramite tampone rino-faringeo) privi di sintomi apparenti.

Gruppo B
30 volontari infettati dal COVID-19 (controllati tramite tampone rinofaringeo) con sintomi evidenti di infezione (temperatura corporea superiore a 37.5 °C. tosse stizzosa, congiuntivite e affanno respiratorio*) ***non sottoposti a ventilazione polmonare.**

Diagnosi preliminare

La diagnosi di COVID-19 può essere formulata anche valutando il titolo anticorpale. Tale metodica utilizza un campione di siero ematico, e può fornire un risultato positivo anche se nel paziente il virus non è più presente nell'organismo. Il primo test anticorpale è stato dimostrato da un team dell'Istituto di virologia di Wuhan il 17 febbraio 2020. Il 25 febbraio, la Duke - NUS Medical School di Singapore ha presentato un altro test anticorpale per COVID-19 che può fornire un risultato entro pochi giorni.

Le linee guida diagnostiche attuali che saranno seguite sono relative alle caratteristiche cliniche e al rischio epidemiologico. Utilizzando tali criteri sarà possibile diagnosticare la malattia in volontari che presentano almeno due dei seguenti sintomi : febbre, segni di polmonite all'*imaging* biomedico, conta dei globuli bianchi normale o ridotta o riduzione della conta dei linfociti. Uno studio recente ha evidenziato che l'esecuzione di una tomografia computerizzata ha una sensibilità maggiore (98%) rispetto alla reazione a catena della polimerasi (71%) nella diagnosi di COVID-19. Per questo motivo tutti i volontari del presente progetto saranno sottoposti ad una tomografia computerizzata.

Personale Medico e Sanitario coinvolto nel progetto

Il sistema di gestione del rischio è stato introdotto nella legislazione europea nel 2004, ma il Piano di gestione del Rischio (Risk Management Plan, RMP). Le linee guida di riferimento sono essenzialmente riferite alla descrizione delle misure per prevenire o minimizzare i rischi, inclusa una valutazione dell'efficacia di tali interventi. Saranno soddisfatti gli eventuali obblighi post- autorizzativi che sono stati imposti come condizione all'AIC (PASS, PAES).

Primo assistente alla ricerca	Il Direttore del laboratorio	Il Responsabile Scientifico
Dott. Francesco Antonelli	*Prof. Simone Beninati*	*Dott. Pasquale Ferorelli*

Journal of Food and Nutrition Sciences
2021; 9(2): 41-47
http://www.sciencepublishinggroup.com/j/jfns
doi: 10.11648/j.jfns.20210902.12
ISSN: 2330-7285 (Print); ISSN: 2330-7293 (Online)

Beneficial Effects of Oral Administration of a Nutritional Supplement in Asymptomatic and Symptomatic COVID-19 Patients

Ferorelli Pasquale[1], Antonelli Francesco[2], Shevchenko Anna[3], Doepp Manfred[4], Lenzi Stefano[5], Beninati Simone[6, *]

[1]Scientific Research Center, Citozeatec, Milan, Italy

[2]Scientific Association (ARSS), Rome, Italy

[3]Department of Pharmacology, Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Russia

[4]Department of Psychology and Sports Science, Giessen Justus, Liebig University Gießen, Giessen, Germany

[5]Department of Health Engineering, Université Européenne de Bruxelles Jean Monnet, Schaerbeek, Belgio

[6]Department of Biology, University of Tor Vergata, Rome, Italy

Email address:
beninati@bio.uniroma2.it (B. Simone)

[*]Corresponding author

To cite this article:
Ferorelli Pasquale, Antonelli Francesco, Shevchenko Anna, Doepp Manfred, Lenzi Stefano, Beninati Simone. Beneficial Effects of Oral Administration of a Nutritional Supplement in Asymptomatic and Symptomatic COVID-19 Patients. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. Vol. 9, No. 2, 2021, pp. 41-47. doi: 10.11648/j.jfns.20210902.12

Received: February 22, 2021; **Accepted**: March 9, 2021; **Published**: March 17, 2021

Abstract: As the 2019 coronavirus disease (COVID-19) pandemic rages, there is an urgent need to identify clinical and laboratory predictors for progression to severe and fatal forms of this disease. In this study, we aimed to evaluate the potential ability of a nutritional supplement to normalize certain hematological, biochemical and immunological biomarkers in patients with and without symptoms of COVID-19. Micronutrients, such as nutritionally essential vitamins and minerals, influence and support every step of the immune response. This investigation was performed by administering a dietary supplement rich in calciferol (vitamin D3), ascorbic acid (vitamin C), folic acid (vitamin B9) and pantothenic acid (vitamin B5) to the enrolled patients for 120 days. All essential elements for a complete physiological enzymatic process. The reported results appear promising from the point of view of the experimental approach adopted. In particular, the scheduled administration of the nutritional supplement rich in micronutrients to asymptomatic and mild to moderate COVID-19 patients has led, in general, to the normalization of the values of some critical biochemical and immunological parameters found to be altered. This nutritional approach, although it does not resolve the disease and therefore does not represent a cure, can improve the quality of life of COVID-19 patients.

Keywords: COVID-19, Nutritional Supplement, Vitamin D3, Vitamin C, Folic Acid

1. Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is spread primarily by aerosols in enclosed environments where temperature and humidity are regulated by air conditioning. Approximately 30% of individuals infected with SARS-CoV-2 develop COVID-19 disease. Of these, some require hospitalization. Individuals over 65 and those with obesity, diabetes, asthma, immunocompromised cancer patients, etc. are at higher risk for hospitalization and death from COVID-19 [1]. Healthy individuals younger than 40 years of age very rarely die from COVID-19. Estimates of COVID-19 mortality rates vary because the definition of COVID-19-related deaths varies. Countries that include only patients, in whom COVID-19 was the leading cause of death, rather than a co-factor, have lower mortality rates. Patients

with COVID-19 may be at risk for malnutrition due to reduced food intake and reduced mobility as a result of their hospital stay. For these reasons, nutritional therapy is an integral part of the approach to the COVID-19 patient. Optimal nutritional intake, coupled with life support therapy, has the potential to improve the outcome of patients with this life-threatening disease, with better and shorter recovery from the acute phase. The nutritional status of the COVID patient and the nutritional therapy to be applied, have met with limited interest in the medical field [2]. Several scientific publications have attempted to provide an overview of functional foods and dietary supplements, which are useful in boosting the immune system and thus be helpful in reducing the adverse effects of COVID-19 and/or improving the patient's overall condition during therapy [3]. Since the role of these functional foods in strengthening the immune system has been widely highlighted, our research aimed to evaluate the potential function of a multifunctional dietary supplement with evident positive properties in improving the quality of life of patients debilitated by different diseases [4]. Of further importance, within the goal of improving the quality of life of the COVID patient is the search for clinical markers that may offer useful indications to evaluate the general state of the patient [5]. As the catastrophic repercussion of COVID-19 continues to spread worldwide, it is imperative to explore biochemical markers that can be used to monitor disease severity in COVID-19 patients. Previous studies have demonstrated that interleukin-6 (IL-6) values and other biochemical parameters of symptomatic patients, such as C-reactive protein (CRP), lactate dehydrogenase (LDH), liver function assessed by serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) and serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT), hemoglobin (HGB), the percentage ratio of red blood cells to the fluid component of blood, plasma (HCT), platelet value (PLT), erythrocyte count (RBC), and white blood cell (WBC) were drastically altered. Therefore, these markers could be explored to collect useful data to predict prognosis in COVID-19 patients in the early stages, so that specific therapeutic interventions can be taken early [6]. Attempts to bring these biochemical parameters back to normal in COVID-19 patients have not been sufficiently addressed at present. Our research work aimed to evaluate the possibility of modifying these clinical parameters through a nutritional supplement capable of interacting with cellular metabolism. The experimental approach we present does not aim to cure the COVID-19 patient, but to improve his general physical condition, to face the disease in the best possible way.

Functional foods are defined as "dietary elements modulated to perform one or more targeted actions in the organism," so, in addition to providing nutrients and energy, they also provide their benefits in the diet during effective treatment in disease, improving the physiological response and/or reducing disease risk [7]. Many foods and functional components are natural compounds, that have been scientifically described to possess immune-boosting properties [8]. Although these natural compounds do not participate in the direct inhibition response against coronavirus, they stimulate the patient's immune system and therefore play an essential role in the preventive defense against COVID-19. Recent studies have reported the use of many prebiotics, probiotics and dietary supplements as natural aids capable of reducing the level of oxidative stress in the body, strengthening its immune response [9]. These functional nutritional elements, including probiotics and micronutrient supplements, help maintain a healthy gut by supporting the microflora and bacterial colonies, claiming immune-boosting properties. Micronutrients, probiotics, flavonoids, carotenoids and medicinal herbs, have been reported beneficial for immune health. Some studies have also suggested the essential need to develop specific functional nutrient-based foods that may play a vital role in combating metabolic disorders, infections, or diseases [10]. Micronutrients, including vitamins and minerals, are the biological or biochemical compounds required in relatively small or trace amounts that participate in essential metabolic reactions and biochemical pathways. The deficiency of such compounds leads to disturbances of function in our body, which results in weakened host immune response [11]. These widely described properties, for nutritional supplements could be valuable in the immune defense of COVID-19 infected individuals. The purpose of the research presented here was to evaluate the effects of a commercial nutritional supplement on hematologic, biochemical, and immunologic biomarkers in patients asymptomatic and symptomatic for COVID-19.

2. Experimental Protocol

Volunteers selected for the project were examined using a World Health Organization (WHO)-approved protocol regarding diagnostic testing for SARS-CoV-2, developed by a team of virologists at the Charité University Hospital in Germany. Volunteers included in the project did not require lung ventilation. Investigations of biochemical parameters included CBC: RBC, WBC, PLT, HGB, HCT, hepatic function test of SGOT and SGPT transaminases, assessment of LDH, CRP, and IL-6 interleukin. These investigations were performed at the beginning of the experimental protocol and during all subsequent monthly controls, up to 120 days of treatment with *Citexivir* (Citozeatec AIC Code: 927091544). Patients were advised to use other useful personal care products. The inclusion in the trial required the preparation of patients to the method of administration of *Citexivir*, according to a specific nutritional protocol. Volunteers have completed the therapy in the home environment according to the rules of quarantine, respecting the rules of prevention necessary for other family members. Any sign of worsening of the patient's health status required immediate hospitalization and exclusion from the project. Specialized health personnel, equipped with all medical safety devices, collected the data related to the results of the planned biological sampling. The partial pressure of oxygen in arterial blood/fractional concentration of inspiratory oxygen (PaO_2/FiO_2) was calculated. Group A: 30 volunteers infected with COVID-19 (controlled by nasopharyngeal molecular swab) with no

apparent symptoms, aged 37-55 years defined as asymptomatic (AST). Group B: 30 volunteers infected with COVID-19 aged 40-60 years (controlled by nasopharyngeal molecular swab) with non-severe but obvious symptoms of infection (body temperature above 37.5°C, cough, conjunctivitis and shortness of breath) not subjected to pulmonary ventilation, defined as symptomatic (ST). The category of ST was defined based on the following criteria: dyspnea, respiratory rate ≥30/min, oximeter oxygen saturation ≤95% in the resting state, and arterial oxygen partial pressure (PaO_2) at inspired oxygen ratio fraction (FiO_2) ≤300 mm Hg. In this group, PaO_2/ FiO_2 values were significantly lower than those in the AST group. All personal data were obtained from the patients' history and collected in electronic medical records respecting privacy criteria. Body temperature was determined at the beginning of the trial (Figure 1).

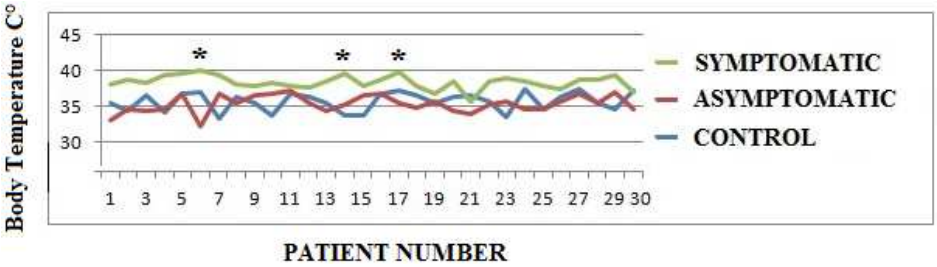


Figure 1. *Changes in body temperature of examined patients determined at time 0 and compared with that of normal volunteers. *Peak values in symptomatic patients.*

3. Results

Patients with COVID-19 may be at risk for malnutrition due to reduced food intake and reduced mobility as a result of a forced hospital stay. For these reasons, nutritional therapy is an integral part of the approach to the COVID-19 patient. Optimal nutritional intake coupled with life support therapy is intended to improve the outcome of patients with this life-threatening disease, including a better and shorter recovery from the acute phase. The nutritional status of the COVID patient and the nutritional therapy to be applied have currently met with limited interest in the medical field. The results we present in this report appear promising from the point of view of the experimental approach taken. In general, all biochemical parameters examined showed changes following COVID-19 infection in both AST and ST. In particular, the following parameters showed increased values: RBC (AST:+42%; ST:+17%) (Figure 2B) SGPT (AST:+41%; ST:+127%) (Figure 2D); LDH (AST:+60%; ST:+275%), IL6 (AST:+75%; ST:+200%) and CRP (AST:+50%; ST:+150%), (Figure 3 A, B, C). In contrast, decreased values were found for HCT (AST:-17%; ST:-39%), PLT (AST:-7%; ST:-49%), WBC (AST:-20%; ST:-80%) (Figure 2 A, B, C) and HGB (AST:-33%; ST:-53%), (Figure 3D). The only variant was SGOT with values lower than control in AST (-23%) but higher in ST (+157%), (Figure 2D). The scheduled 120-day administration of the dietary supplement *Citexivir* to AST and ST patients with COVID-19 led, in general, to normalization of the values of some investigated clinical parameters (Figures 2, 3). The only exception was observed for RBC, which after 120 days of treatment normalized in AST but remained slightly higher in ST patients (Figure 2B). Notably, the positive effect of treating both AST and ST patients with the adopted nutritional supplement is evident.

The percentage changes observed at the end of treatment of COVID -19 AST and ST patients compared to the initial values, highlight the normalization of all biochemical parameters examined, following the administration of *Citexivir*, included in the prescribed diet for 120 days (Figure 4). The values found after 120 days of treatment, compared with those of the controls, were as follows: SGPT (AST:-32%; ST:-20%) (Figure 2D); LDH (AST:+11%; ST:+84%), IL6 (AST:+13%; ST:+50%), and CRP (AST:+40%; ST:+60%), (Figure 3 A, B, C); HCT (AST: -20%; ST:-10%), PLT (AST:+13%; ST:+9%), WBC (AST:-5%; ST:-21%), RBC (AST:-14%; ST:+7%), (Figure 2 A, B, C) and HGB (AST:-33%; ST:+17%), (Figure 3D). The only variant was SGOT with values lower than control in AST (-8%) but slightly higher in ST (+25%), (Figure 2D). Two parameters in particular (HGB and CRP), in the ST patients appeared to increase, exceeding the value of the controls (Figure 3D). As can be seen from the data presented, a marked lymphopenia was observed in ST patients, which was significantly reduced in AST and mitigated in ST after 120 days of treatment with *Citexivir* (Figure 2B). Lymphocytes play a crucial role in maintaining immune homeostasis and the inflammatory response throughout the body. Understanding the mechanism of reduced blood lymphocyte levels should provide an effective strategy for the treatment of COVID-19. The virus may directly destroy lymphatic organs. The acute decline in lymphocytes could be related to lymphocyte function, and direct damage by the new coronavirus virus to organs such as the thymus and spleen cannot be ruled out. In conclusion, lymphopenia is an effective and reliable indicator of severity and hospitalization in COVID-19 patients [12].

4. Discussion

Many people of all ages have one or more micronutrient deficiencies. Micronutrient supplementation may play an important role in increasing resistance to infection by improving immune function [13]. The main objective of this research was to expand our current knowledge on the effectiveness of micronutrients in supporting immunity,

particularly regarding respiratory virus infections. It is now recognized that an adequate nutritional status is crucial for the development, maintenance and expression of the immune response [14]. Micronutrients, such as nutritionally essential vitamins and minerals, influence and support each stage of the immune response. Micronutrient deficiency can affect both innate and adaptive immunity, causing immunosuppression and thus increasing susceptibility to infection [15].

Furthermore, infections and inadequate nutritional status have a synergistic relationship. The same immune response to an infection exacerbates poor nutritional status and causes increased micronutrient demand [14]. Viral infections are a major cause of morbidity and mortality worldwide [16], as demonstrated by both seasonal influenza and the recent outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the new severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS- CoV-2) [17].

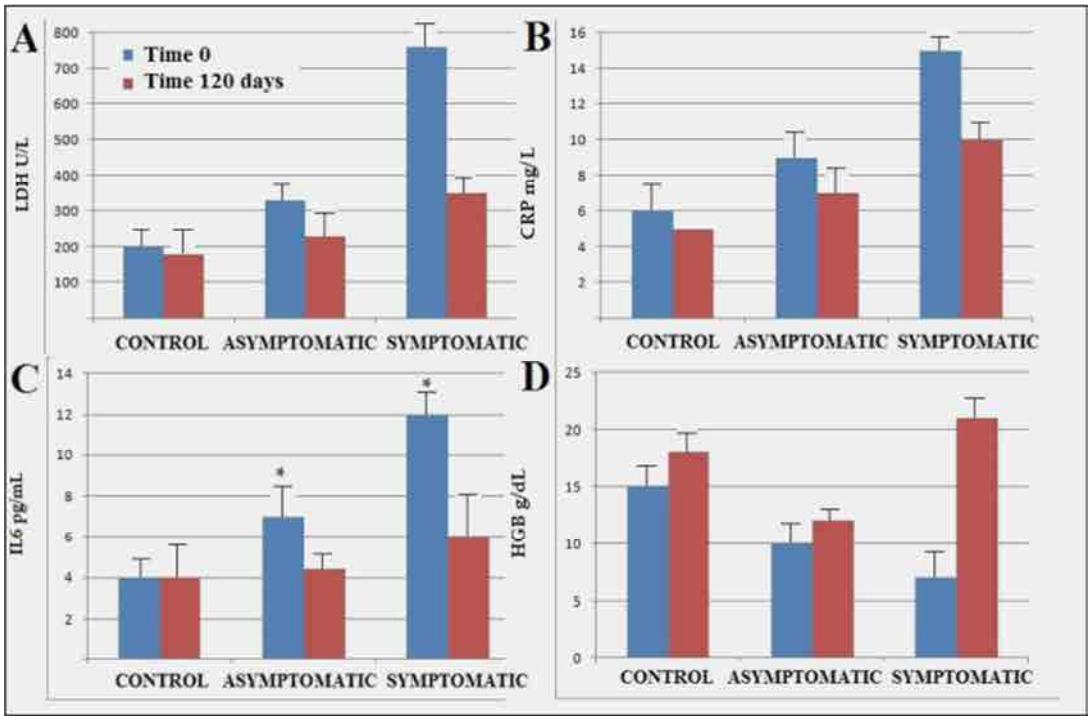


Figure 2. *Change in initial values of biochemical parameters in COVID-19, AST, and ST patients compared with those observed after 120 days of Citexivir treatment. A: HCT; B: RBC/WBC; C: PLT; D: SGOT/SGPT. Values represent mean ±SD of data collected monthly. P<0.05*

A well-balanced diet is essential to achieve an optimal intake of all essential vitamins and elements. However, in the general population and even in more developed countries, it can be difficult to obtain an adequate intake of micronutrients compared to the recommended daily intake (RDA). This study showed that the levels of some biochemical, hematological and inflammatory parameters in the blood of AST and ST patients infected with COVID-19 appeared significantly altered, to the point of triggering the release of inflammatory mediators that can potentially cause immune damage targeting the lungs and other related organs. The inclusion in the diet of *Citexivir* for a period of 4 months has changed the biochemical parameters examined in both AST and ST patients bringing these values close to normal. In particular, elevated levels of CRP, IL6, LDH, WBC, SGOT and SGPT were found. The data obtained showed that CRP levels increased in AST patients and reached higher levels in ST patients. CRP is related to inflammation and its concentration is not affected by factors such as age, sex, and physical condition [18]. Since CRP levels were positively correlated with the presence of lung injury, it was suggested that in the early stage of COVID-19, CRP levels could be considered useful as diagnostic data and can be used for the early diagnosis of pneumonia [19]. Our results suggest that a CRP> 14 mg/L should prompt investigation for pneumonia. The possible explanation for the observed increase in IL-6 particularly in ST patients could derive from the mechanism related to the 2019-nCoV virus which, infecting the human body, enters the cell via the angiotensin converting enzyme 2 receptor (ACE2). This makes immune cells overactive and produces numerous inflammatory factors, to generate an inflammatory storm. These series of events induce a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) along with acute respiratory distress syndrome (ARDS) and multi-organ dysfunction syndrome (MODS). A study on the level of inflammatory factors in the early phase of septic shock showed that the level of IL-6 in patients with septic shock was significantly higher than that in patients with no sepsis and IL-6 was an independent risk factor for septic shock [20]. However, IL-6 cannot distinguish bacterial infection or viral infection, and in addition, some noninfectious factors such as trauma and surgery may cause an increase in IL-6.

LDH is an intracellular enzyme present in cells of almost all organs, which catalyzes the interconversion of pyruvate and lactate, with concomitant interconversion of NADH and NAD+ [21].

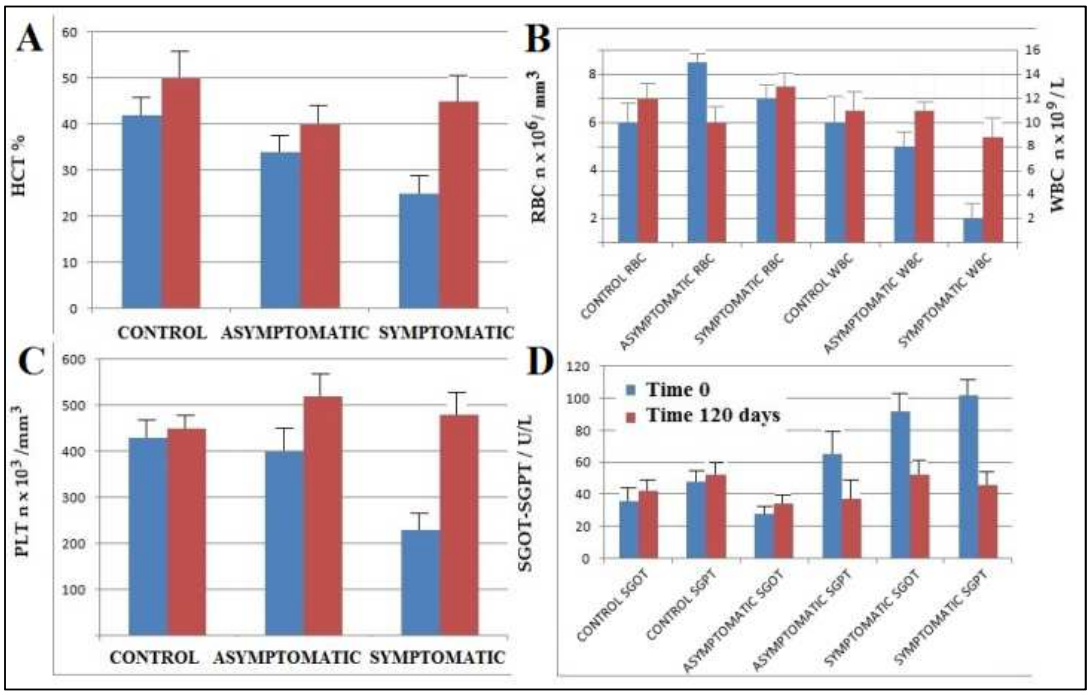


Figure 3. *Change in initial values of biochemical parameters in COVID-19, AST, and ST patients compared with those observed after 120 days of treatment with Citexivir. A: LDH; B: CRP; C: IL6; D: HGB. Values represent mean ±SD of data collected monthly. P<0.05.*

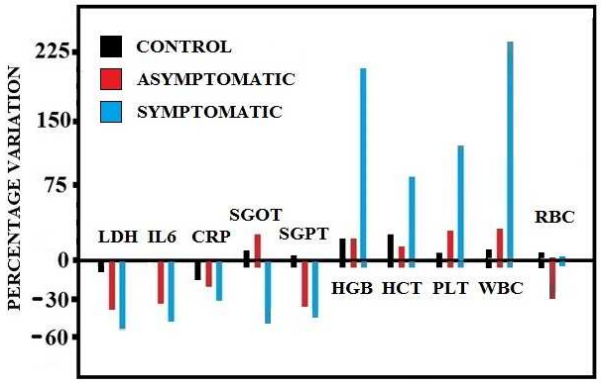


Figure 4. *Percentage change in values of assayed biochemical parameters after 120 days of treatment of AST and ST patients compared with initial values found before treatment with Citexivir.*

LDH is a reliable marker of hemolysis. Some large-scale retrospective studies indicate that the LDH assay is exceptionally accurate in selecting severe from mild cases of COVID-19. LDH values increase two- to three-fold in worst-case scenarios in parallel with the decrease in hemoglobin [22, 23]. Similarly, a relevant reduction in sideremia has been reported in ICU patients, with lower serum iron levels associated with severe respiratory failure related to hypoxemia [24]. In general, LDH has been associated with worse outcomes in patients with viral infections. In fact, elevated LDH levels have been associated with an approximately 6-fold increase in the odds of developing severe disease and increased odds of mortality in patients with COVID-19. The results of our research have shown that the administration of a nutritional supplement leads to a clear reduction of LDH values, which were found to be particularly high in control ST patients. Regarding the altered values of transaminases (SGOT and SGPT) it is necessary to consider that patients with Covid-19 present hepatic alterations reported by increases in serum transaminases, γ-glutamyltransferase (GGt) and often bilirubin. Prominent signs of hepatopathy. In milder cases, the alterations are often transient and do not require specific treatment. Severe cases, on the other hand, develop a reduction in serum albumin that often reflects an altered metabolism and a general state of inflammation. Recurrent leukopenia is instead associated with CD3+ T lymphocyte depletion, which is closely linked to bursts of cytokines such as IL-6 [25]. Despite the recognized role of immunoinflammatory processes in the pathophysiology of this disease, alteration of hemoglobin, hypoxemia and iron dysmetabolism represent additional key factors to be investigated within the diagnostic-therapeutic approach. The observed decrease in HGB, consequent to the reduction of RBCs and in general HCT, observed in both AST and ST, reduces the efficiency of oxygen transport, resulting in tissue hypoxia. Tissue hypoxia could lead to multiple organ disorders. Taking renal failure as an example, fulminant anoxia could lead to sympathetic nerve excitation and decreased glomerular plasma flow, which in turn leads to a reduction in glomerular filtration rate. During our treatment of CO-VID-19 patients, oliguria or anuria were common in

critically ill patients, indicating a reduction in the glomerular plasma flow [26].

In an attempt to justify the evidence presented, it is useful to mention that among the various components of the nutritional supplement tested (Citexivir) are calciferol (vitamin D3), ascorbic acid (vitamin C), folic acid (vitamin B9) and pantothenic acid (vitamin B5). Some of these nutrients play key roles in maintaining the integrity and function of the immune system, presenting synergistic actions at crucial stages in the immune response. Among these elements, vitamins C and D stand out for having immunomodulatory functions and for playing roles in preserving the physical barriers of tissues. Vitamin D is a hormone that acts on many genes expressed by immune cells. Evidence linking vitamin D deficiency with the severity of COVID-19 is circumstantial but considerable [27]. In addition, calciferol induces the expression of antimicrobial peptides that may reduce viral replication, regulating pro-inflammatory/anti-inflammatory cytokine levels [28]. Ascorbic acid is a water-soluble micronutrient with antioxidant properties that plays a crucial role in the immune system by supporting the epithelial barrier against pathogen entry and cellular functions of the innate and adaptive immune systems [29]. As an antioxidant, vitamin C prevents damage to enzymatic biomolecules, resulting from exposure to oxidants generated by normal metabolism and exposure to pollutants and toxins. In addition, this vitamin is a cofactor of several enzymes that are involved in the stabilization of the tertiary structure of collagen, in the biosynthesis of hormones such as norepinephrine, catecholamines, vasopressin, and in DNA and histone methylation and is therefore important for the occurrence of epigenetic events [30]. In the current literature, it is reported that deficiency of one or more of these two elements impairs the immune response, making an individual more vulnerable to viral infections and a worse prognosis of the disease [31].

While there are limited studies demonstrating the effects of pantothenic acid on the immune system, folic acid has recently been shown to inhibit furin, avoiding binding by the SARS-CoV-2 spike protein, preventing entry into cells and turnover of the virus. Furin is one of the proteases responsible for proteolytic cleavage of the HIV envelope polyprotein precursor from gp160 to gp120 and gp41 prior to viral assembly [32]. Several pathological conditions such as atherosclerosis, cancer, and viral infectious diseases are linked to reduced activity of this enzyme. Folic acid increases in vitro the production of nitric oxide (NO) directly and prolongs its duration of action; effects that could be of benefit in reversing pulmonary hypertension and severe hypoxemia. Therefore, it has been suggested that folic acid might be useful for the management of COVID-19-associated respiratory disease in its early stages [33]. A recent publication reports that folic acid and its derivatives tetrahydrofolic acid and 5-methyl tetrahydrofolic acid have strong and stable binding affinities against SARS-CoV-2, suggesting that folic acid could be used as a therapeutic approach for the management of COVID-19 infection [34].

5. Conclusions

In conclusion, our study shows that the levels of various biochemical parameters in the blood of AST and ST patients infected with COVID-19 are significantly altered, triggering the release of inflammatory mediators and causing immune damage targeting the lungs and other related organs. Therefore, suppressing inflammation and regulating the body's immune imbalance may be an important aspect of treating COVID-19 patients. In particular, the research has allowed to evaluate the effects of a dietary supplementation program by means of a nutritional supplement containing among the various components vitamins D3, C, B9 and B5, which have significantly returned to normal the biochemical, hematological and inflammatory parameters of patients infected with COVID-19, improving their quality of life. The nutritional protocol adopted, while not claiming to be able to reduce the symptoms of coronavirus infection nor cure the disease, allows to improve the general physical conditions of the patient.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We are grateful to ARSS, Italy, for financial support to study the possibility of nutritional therapies for COVID-19 patients.

References

[1] Bonafè M., Prattichizzo F., Giuliani A., et al. Inflamm-aging: Why older men are the most susceptible to SARS-CoV-2 complicated outcomes. Cytokine Growth Factor Rev. 2020; 53: 33–37.

[2] Alschuler L, Chiasson AM, Horwitz R, et al. Integrative medicine considerations for convalescence from mild-to-moderate COVID-19 disease. V. Explore (NY). 2020: S1550-8307(20)30417-1.

[3] Álvarez J, Lallena S, Bernal M. Nutrition and the COVID-19 pandemic. Medicine (Madr). 2020: 13 (23): 1311-1321.

[4] Torricelli P, Antonelli F, Ferorelli P, et al**.** Oral nutritional supplement prevents weight loss and reduces side effects in patients in advanced lung cancer chemotherapy. Amino Acids. 2020; 52 (3): 445-451.

[5] Li T, Wang X, Zhuang X, et al. Baseline characteristics and changes of biomarkers in disease course predict prognosis of patients with COVID-19. Intern Emerg Med. 2021; 10: 1-8.

[6] Alamin AA, Yahia AIO. Hematological Parameters Predict Disease Severity and Progression in Patients with COVID-19: a Review Article. Clin Lab. 2021; 67 (1).

[7] Muthuvattur Pallath M, Ahirwar AK, et al. COVID-19 and nutritional deficiency: a review of existing knowledge. Horm Mol Biol Clin Investig. 2021; (Online ahead of print).

[8] Pastor N, Collado MC, Manzoni P. Phytonutrient and Nutraceutical Action against COVID-19: Current Review of Characteristics and Benefits. Nutrients. 2021; 13 (2): 464, 472.

[9] Gong S, Ji X, Su J, Wang Y, et al. Yeast Fermentate Prebiotic Ameliorates Allergic Asthma, Associating with Inhibiting Inflammation and Reducing Oxidative Stress Level through Suppressing Autophagy. Mediators Inflamm. 2021; 4080935

[10] Mannucci C, Casciaro M, Sorbara EE, et al. Nutraceuticals against Oxidative Stress in Autoimmune Disorders. Antioxidants (Basel). 2021; 10 (2): 261.

[11] Brenner H. Vitamin D Supplementation to Prevent COVID-19 Infections and Deaths-Accumulating Evidence from Epidemiological and Intervention Studies Calls for Immediate Action. Nutrients. 2021; 13 (2): 411.

[12] Li Tan, Qi Wang, Duanyang Zhang, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. Signal Transduct Target Ther. 2020; 5: 33.

[13] Calder PC, Carr AC, Gombart AF, Eggersdorfer M. Optimal Nutritional Status for a Well-Functioning Immune System Is an Important Factor to Protect against Viral Infections. Nutrients. 2020; 12 (4): 1181.

[14] Sayah W, Berkane I, Guermache I, et al. Interleukin-6, procalcitonin and neutrophil-to-lymphocyte ratio: Potential immune-inflammatory parameters to identify severe and fatal forms of COVID-19. Cytokine. 2021; 141: 155428.

[15] Gorji A, Khaleghi Ghadiri M. Potential roles of micronutrient deficiency and immune system dysfunction in the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. Nutrition. 2021; 82: 111047.

[16] Hakan Erdem and Serhat Ünal. New global viral threats. Saudi Med J. 2015; 36 (4): 393–398.

[17] Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. Viruses. 2021; 13 (2): 202, 208.

[18] Bilgir O, Bilgir F, Calan M. Comparison of pre-and post-levothyroxine high-sensitivity C-reactive protein and fetuin-A levels in subclinical hypothyroidism. Clinics 2015; 70 (2): 97–101.

[19] Warusevitane A, Karunatilake D, Sim J, et al. Early diagnosis of pneumonia in severe stroke: clinical features and the diagnostic role of C-reactive protein. PloS one 2016; 11 (3): e0150269.

[20] Shi **X**, Qin L, Yang L, et al. Value of interleukin-6 and $CD4^+$ T-lymphocytopenia in assessing the severity and prognosis of coronavirus disease 2019]. 2020; 32 (10): 1165-1170.

[21] Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. Cell. 2008; 134 (5): 703–707.

[22] Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult in patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet 2020; 395: 1054-1060.

[23] Han Y, Zhang H, Mu S, et al. Lactate dehydrogenase, a risk factor of severe COVID-19 patients. Aging (Albany NY). 2020; 12 (12): 11245–11258.

[24] Shah A, Frost J, Aaron L et al. Systemic hypoferraemia and severity of hypoxaemic respiratory failure in COVID-19. Crit. Care 2020; 24 (1): 320.

[25] Xiaonan Zhang, Yun Tan, Yun Ling, et al. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19. Nature, 583, 2020, 437-441.

[26] Akbari H, Tabrizi R, Lankarani KB, et al. The role of cytokine profile and lymphocyte subsets in the severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. Life Sci. 2020; 258: 118167.

[27] Boulkrane MS, Ilina V, Melchakov R, Fedotova J, et al. COVID-19 Disease and Vitamin D: A Mini-Review. Front Pharmacol. 2020; 11: 604579.

[28] Calton EK, Keane KN, Newsholme P, Soares MJ. The Impact of Vitamin D Levels on Inflammatory Status: A Systematic Review of Immune Cell Studies. PLoS One. 2015; 10 (11): e0141770.

[29] Jovic TH, Ali SR, Ibrahim N, et al.. Could vitamins help in the fight against COVID-19? Nutrients. 2020; 12: 2550.

[30] Englard S, Seifter S. The biochemical functions of ascorbic acid. Annu Rev Nutr. 1986; 6: 365–406. 10.1146/annurev.nu.06.070186.002053.

[31] José João Name, Ana Carolina Remondi Souza, Andrea Rodrigues Vasconcelos, et al. Zinc, Vitamin D and Vitamin C: Perspectives for COVID-19 With a Focus on Physical Tissue Barrier Integrity. Front Nutr. 2020; 7: 606398.

[32] Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, et al. "Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glyco-protein gp160". Nature. 1992; 360 (6402): 358–361.

[33] Esko Wiltshire, Alexia Sophie Peña, Karen MacKenzie, et al. High dose folic acid is a potential treatment for pulmonary hypertension, including when associated with COVID-19 pneumonia. Med Hypotheses. 2020; 143: 110142.

[34] Kumar V. Kancharla S., Jena M. K. In silico virtual screening-based study of nutraceuticals predicts the therapeutic potentials of folic acid and its derivatives against COVID-19. Virusdisease. 2021; 1-9.

9.3 COVID 19 - Lettera di accettazione 1541331

Science Publishing Group
1 Rockefeller Plaza, 10th and 11th Floors,
New York, NY 10020 U.S.A.

Acceptance Letter

Reference: JFNS **Date:** March 9, 2021

Dear Ferorelli Pasquale, Antonelli Francesco, Shevchenko Anna,
Doepp Manfred, Lenzi Stefano, Beninati Simone,

Thanks for your contribution to ***Journal of Food and Nutrition Sciences (JFNS)***.
(ISSN Print: 2330-7285; ISSN Online: 2330-7293)

We are pleased to inform you that your paper:
Manuscript Number: 1541331
Title: Beneficial Effects of Oral Administration of a Nutritional Supplement in Asymptomatic and Symptomatic COVID-19 Patients
has been accepted for publishing. Congratulations!

Best Regards
Journal of Food and Nutrition Sciences (JFNS)
http://www.sciencepublishinggroup.com/j/jfns
Science Publishing Group
Email: journal@sciencepublishinggroup.com

For and on behalf of
SCIENCE PUBLISHING GROUP INC.

Authorized Signature(s)

10

CARCINOMA EPATICO

10.1 CARCINOMA EPATICO - Ricerca Uniroma 2

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
LABORATORIO DI ONCOLOGIA SPERIMENTALE E ISTOLOGIA

Modello epatico di organo coltura

1. Introduzione

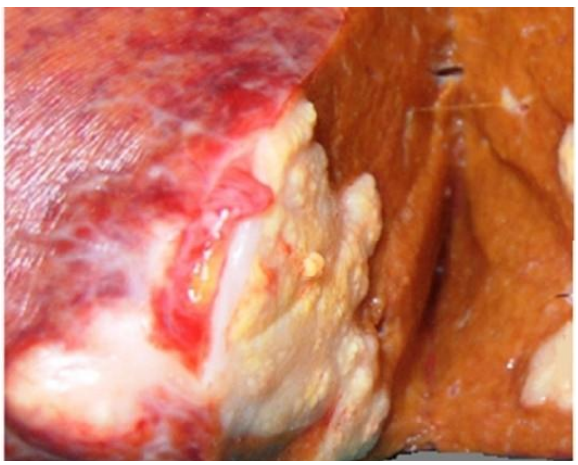
I modelli di espianto d'organo offrono diversi vantaggi, rilevanti per gli studi dei meccanismi fisiopatologici, come danno cellulare, la secrezione, la differenziazione e lo sviluppo di neoplasie. Organi o piccoli espianti possono essere rimossi *in vivo* e mantenuti in coltura per lunghi periodi, se particolare attenzione è rivolta alla composizione dei mezzi di coltura, la selezione del substrato, e l'atmosfera di incubazione.
Nei tessuti umani, ottenuti da autopsia o da intervento chirurgico, ulteriore attenzione deve essere rivolta all'intervallo post-mortem, la temperatura, l'idratazione e la causa della morte.
Attualmente stiamo utilizzando nel nostro laboratorio, colture di espianto d'organo, invaso da tumori maligni, per stabilire la possibilità dell'azione diretta di agenti antineoplastici, in un ambiente cellulare, caratterizzato da vari tipi di cellule e tessuti, all'interno di un organo.
Ci proponiamo, in particolare, di studiare l'azione antineoplastica *in vivo*, di un integratore alimentare, Citozym, prodotto dalla CITOZEATEC, S.r.l. (Peschiera Borromeo, Milano), del quale in pubblicazioni precedenti abbiamo evidenziato l'attività antineoplastica *in vitro* [1]. Il fine è di evitare la degradazione operata dall'ambiente gastrico, usando come bersaglio, direttamente l'organo colpito dal tumore. Tale sperimentazione dovrebbe fornire nuove evidenze, sull'alta efficienza della somministrazione dell'agente direttamente in circolo, che quindi dovrebbe risultare molto più attiva della usuale somministrazione orale. Ovviamente queste prove sperimentali saranno preziose per proporre un trial clinico futuro.
La parte preliminare di questo progetto, che presentiamo, è stata eseguita su due biopsie epatiche, ottenute dall' ablazione chirurgica di un carcinoma epatocellulare, di stadio III C (T3-N1-M0 – AJCC), in pazienti rispettivamente di anni 67 e 74.
Sulla base di una nostra precedente sperimentazione, effettuata su espianti epatici di topi C57BL/6 [2], il mezzo di coltura dell'espianto utilizzato è stato arricchito con una concentrazione finale di Citozym del 10% e del 15% .

2. Risultati Preliminari

2.1 Preparazione degli espianti d'organo

L'espianto d'organo, prelevato e istologicamente definito come invaso da carcinoma epatocellulare di stadio III C, lavato con soluzione salina (PBS 2%) e posto in coltura in presenza di ossigenazione continua. E' stato valutato il volume della massa tumorale principale, ignorando i noduli più piccoli.
Si evidenzia che la fase successiva della sperimentazione, in corso di lavorazione, si centrerà su organi interi, prelevati immediatamente post-mortem, che verranno mantenuti vitali con perfusione attraverso la vena porta.

Figura 1. Biopsia epatica

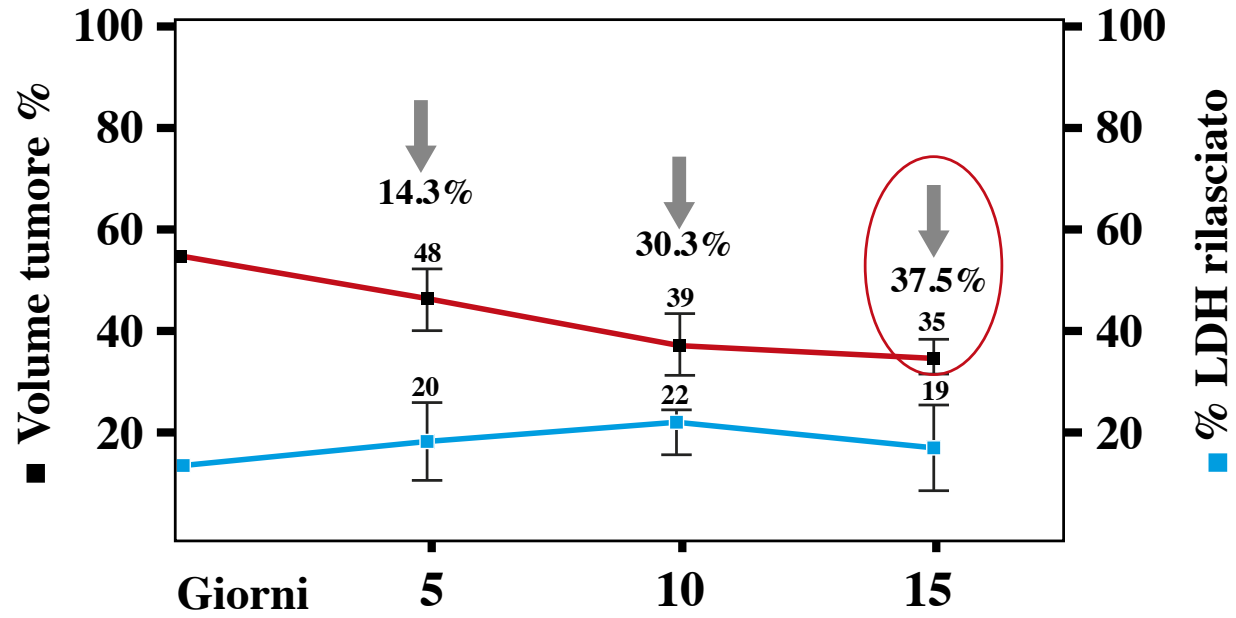


2.2 Coltura di espianti d'organo.
I mezzi di coltura utilizzati sono stati preliminarmente preparati in accordo con i dati ottenuti in un precedente lavoro in corso di stampa [2]. In ***Figura 1***, un espianto epatico invaso da epatocarcinoma, è evidente la massa tumorale che appare immersa nel parenchima epatico.

2.3 Valutazione della dimensione della massa tumorale e del danno cellulare
La prima fase del protocollo sperimentale compendia la valutazione iniziale della massa tumorale, espressa come volume parziale su volume totale della biopsia. Tale procedura è effettuata misurando con appositi specilli il diametro della massa tumorale, che appare sferoidale (***Figura 1***). Tale misura è quindi rapportata al volume totale della biopsia.

I valori sono espressi in percentuale di invasione. La ***Figura 2*** indica le variazioni percentuali del volume della massa tumorale in relazione al trattamento di coltura in presenza del 10% di Citozym.
La concentrazione del 15% è risultata citotossica con livelli di LDH rilasciata superiori del 45%.
È stato possibile ridurre la massa tumorale del 37.5% ed estendere i tempi di coltura a 15 giorni, con valori di LDH inferiori del 20%, sulla base delle esperienze precedenti riportate sulla pubblicazione in corso di stampa [2].

Figura 2



Riduzione percentuale della massa tumorale durante i 15 giorni di trattamento dell'espianto di fegato con il 10% di Citozym nel mezzo di coltura. Valutazione del danno cellulare conseguente all'incubazione dell'espianto valutato tramite i livelli di LDH rilasciato nel mezzo.
Questo risultato è stato possibile grazie alla composizione del terreno di coltura degli espianti e l'ossigenazione continua della coltura [2].

3. Parte successiva del programma sperimentale

Attualmente procediamo con la perfusione di organi interi, prelevati postmortem su 4 pazienti portatori di carcinoma epatocellulare di stadio IV C.
I sistemi di perfusione adottati sono indicati nella ***Figura 3***. La soluzione di trattamento ha una concentrazione in Citozym del 15%(1).
Preliminare al trattamento è la pre-perfusione con soluzione fisiologica, eparina, HEPES e antibiotici.
Tale metodica permette di mantenere vitale l'organo per periodi sufficienti per poter valutare eventuli riduzione di volume dei noduli tumorali.

(1) Necessaria a causa della diluizione operata dalla perfusione.

Figura 3

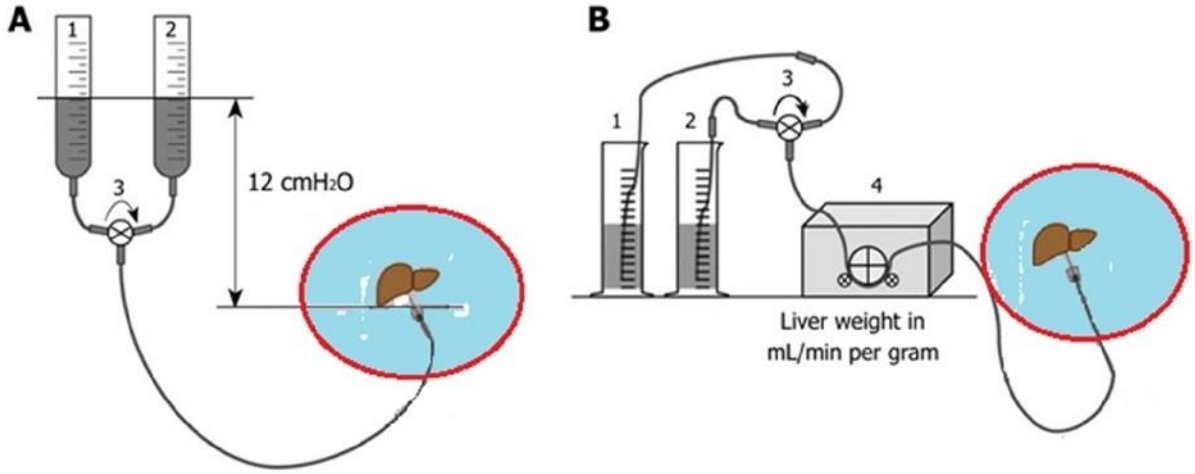


Diagramma schematico raffigurante le diverse e più frequentemente utilizzati metodi di perfusione-trattamento, per il tessuto epatico.
***A:** Perfusione e trattamento a gravità-mediata, utilizzando la pressione dell'acqua a 12 cm: (1) buffer di pre-perfusione; (2) soluzione di trattamento; (3) Sistema di tri-valvola, che facilita la commutazione tra le due soluzioni; e (4) incannulamento della vena porta.*
***B:** Pompa di perfusione a un flusso di 1 ml / g tessuto epatico: (1) buffer di pre-perfusione; (2) soluzione trattamento; (3) Sistema di tri-valvola; (4) pompa peristaltica a basso flusso; e (5) incannulamento della vena porta.*

4. Conclusioni

Mantenere vitali organi invasi da neoplasie, prelevati post-mortem, permette di poter studiare i parametri correlati con la potenziale attività antineoplastica di un agente, in condizioni molto simili a quelle che si riscontrano nell'organismo umano. La perfusione con soluzioni nutritive mima entro certi limiti, la perfusione ematica, apportando tutti i **nutrienti necessari per mantenere vitale il tessuto e irrorare la massa tumorale. La metodica da noi utilizzata nella sperimentazione può dimostrare in maniera inequivocabile, l'attività antitumorale della miscela di componenti che caratterizza il Citozym, superando i limiti, il più delle volte contestati, della coltura tumorale *in vitro* o l'uso di animali, indubbiamente lontani dal modello umano.** I risultati preliminari, che presentiamo dimostrano, come la coltura di un espianto epatico invaso da un carcinoma epatocellulare, ha permesso di evidenziare l'attività antiproliferativa di una soluzione di Citozym, a bassa concentrazione, sulla massa tumorale. In conclusione, si può affermare che il modello proposto permette di ottenere risultati sicuramente più attendibili che potranno essere molto utili per lo studio dei meccanismi molecolari, alla base dell'attività antineoplastica del Citozym.

Bibliografia

[1] *Antonelli F and Beninati S. Enhanced survival of B16-F10 melanoma tumour- bearing C57BL6/N mice treated with a mixture of antioxidants in: Recent Res Devel in Life Sci. Research Signpost, Trivandrum India.2011;5:51-60*

[2] *Torricelli et al. Organ Culture Model of Liver for the Study of Cancer Treatment for Hepatocellular Carcinoma. Cancer Research Journal 2016 in press].*

Roma, 07/03/2016

Prof. Simone Beninati

Dott. Francesco Antonelli

Cancer Research Journal
2016; 4(5): 69-72
http://www.sciencepublishinggroup.com/j/crj
doi: 10.11648/j.crj.20160405.11
ISSN: 2330-8192 (Print); ISSN: 2330-8214 (Online)

Perfusion of Multiple Micronutrients Supplement of HCC-Invaded Human Liver Reduces Oxidative Stress and Proliferation of Cancer Cells

Torricelli Piera[1], Ferorelli Pasquale[2], Shevchenko Anna[3], Antonelli Francesco[2], Siciliano Alberto[2], De Martino Angelo[2], Beninati Simone[2]

[1]Department SPES, University of Molise, Campobasso, Italy
[2]University of Tor Vergata, Department of Biology, Rome, Italy
[3]People's Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Email adress:
beninati@bio.uniroma2.it (B. Simone)

To cite this article:
Torricelli Piera, Ferorelli Pasquale, Shevchenko Anna, Antonelli Francesco, Siciliano Alberto, De Martino Angelo, Beninati Simone. Perfusion of Multiple Micronutrients Supplement of HCC-Invaded Human Liver Reduces Oxidative Stress and Proliferation of Cancer Cells. *Cancer Research Journal*. Vol. 4, No. 5, 2016, pp. 69-72. doi: 10.11648/j.crj.20160405.11

Received: August 4, 2016; **Accepted**: August 26, 2016; **Published**: September 21, 2016

Abstract: Administration of the chemotherapeutic agent by organ perfusion is more effective than the systemic administration. The active drug is reached by the tumor, to a higher concentration, and normal tissues are spared from major damages. The perfusion of various areas of the body is a recent goal of the experimental and clinical trials. Fatal malignancies observed in humans occur mainly in the abdominal area of the body, The development of a clinically applicable technique for the perfusion of this area is desirable. This report covers the laboratory studies, carried out in the development of a liver perfusion technique for chemotherapy. The results obtained have allowed us to highlight that, the potential anticancer activity of Citozym, a micronutrients supplement, is likely the result of the inhibition of oxidative stress. This work is the preliminary evidence, of the possible mechanism by which Citozym exerts its antineoplastic activity.

Keywords: Antioxidants, Organ Perfusion, Oxidative Stress, Micronutrients, HCC, Hepatocarcinoma

1. Introduction

Organs or small explants can be removed in vivo and maintained in culture for long periods, if particular attention is paid to the composition of the culture media, the selection of the substrate, and the incubation atmosphere. The explant organ models offer several benefits, relevant to studies of pathophysiological mechanisms, such as cell damage, secretion, differentiation and the development of tumors. In human tissues, obtained from autopsy or surgery, additional attention should be paid to the range post-mortem, the temperature, the moisture and the cause of death. Currently, cultured explant organs, invaded by malignant tumors, are used in our lab, to determine the possibilities of direct action of antineoplastic agents, in an environment, characterized by various types of cells and tissues. In a previous report we proposed, to study the potential antineoplastic in vivo activity, of a food supplement, commercially available as Citozym (CIZ), which have highlighted a cellular protective activity in vitro [1]. This report is concerned with the laboratory studies, carried out in the development of a technique for isolated abdominal organs perfusion. The main aim of this novel approach is to avoid gastric degradation of the active molecules, using as a target directly the organ affected by cancer. Such testing should provide new evidences on the high efficiency of the agent administered directly, into the circulation, which then should be much more active than usual respect oral administration. These tests will be valuable in order to propose future clinical trials. On the basis of earlier experiments, performed on liver explants of C57BL6 / N mice [2], the culture medium used for the perfusion of explants of human liver, invaded by hepatocarcinoma was enriched with a 15% final concentration of CIZ. It is very important to consider that livers, cold preserved during variable periods of ischemia, suffer functional, morphological and hemodynamic alteration, which are exacerbated when they are perfused. One important injury is glycogen depletion during cold

ischemia/perfusion. How liver can restore their energy, during perfusion, is related with the preservation time, nutritional status of the donor, and the preservation solution used. However, there are some treatments that help livers to preserve their energy storage. It is feasible that the highly antioxidant solution of CIZ, rich in essential elements for cell metabolism, is able to protect the liver, by reducing the oxidative stress, during visceral perfusion.

Functional status and cell viability can be checked by evaluating the levels of lactate dehydrogenase (LDH) released into the perfusion medium. LDH is involved in tumor initiation and metabolism. Cancer cells rely on increased glycolysis resulting in increased lactate production instead of aerobic respiration in the mitochondria, even under oxygen-sufficient conditions [3]. This state of fermentative glycolysis is catalyzed by the A form of LDH. This mechanism allows tumorous cells to convert the majority of their glucose stores, into lactate, regardless of oxygen availability, shifting use of glucose metabolites from simple energy production to the promotion of accelerated cell growth and replication. It has been reported that upregulation of LDH ensures both an efficient anaerobic glycolytic metabolism and in hypoxic conditions, a reduced dependence on oxygen of the tumor cells. The role of LDH in hepatocellular carcinoma (HCC) has been investigated in heterogeneous populations of patients. The levels of plasmatic LDH is considered a potential biomarker in retrospective, small, and nonfocused studies in patients undergoing surgery, transarterial chemoembolization (TACE), and systemic therapy [3].

For this reason, LDH and the possibility of inhibiting its activity, has been identified as a promising target in cancer treatments focused on preventing carcinogenic cells from proliferating. Hence, the preservation solution has an important role in reducing liver damages, during cold ischemia/perfusion and in restoring liver energy storage. In conclusion, the aim of this work is to present studies performed on liver explants and whole organs by different preservation/perfusion media to test the possible improvement of the antineoplastic potential of CIZ on livers, explanted and cultured for several days.

2. Experimental Protocol

2.1. Patients

Four liver transplanted living-donor patients with a median age at of 59 years (range; 52-68 years), were the sourse of explanted livers affected with HCC lesions. The specimen were considered as surplus of surgical tissue and donate by Prof. Kisinawa (Chiba Surgical Clinic, Chiba, Japan). Two liver explants were tested under perfusion with 15% CIZ, and two liver explants were perfused with the same serum-free perfusion medium without CIZ, but with 15% sucrose. The experimental procedures were conducted according to the principles expressed in the Recommendation R (2006) 4 of the European Council, on the Biological Materials of Human Origin (Strasbourg - 15 March 2006).

2.2. Liver Cultures and Perfusion

The explanted organs were histologically defined as invaded with hepatocellular carcinoma BCLC staging 5- C [4-5], washed with saline solution (PBS 2%) and placed in culture in the presence of continuous oxygenation. Liver explants were immersed in 600 mL of a defined serum-free medium and incubated for 10 days at 37 °C in a humidified chamber (5% C02). Defined serum-free perfusion medium composition, was DMEM/F12 supplemented with 15 mM HEPES, sodium bicarbonate 45 mM (pH 7.45) and transferrin 6 mM, selenium 7 mM, insulin 8 mM, triiodothyronine 2 mM, prostaglandin E1 6 mM and 100 IU/mL of Penicillin and 100ug/mL of Streptomycin without fungicide.

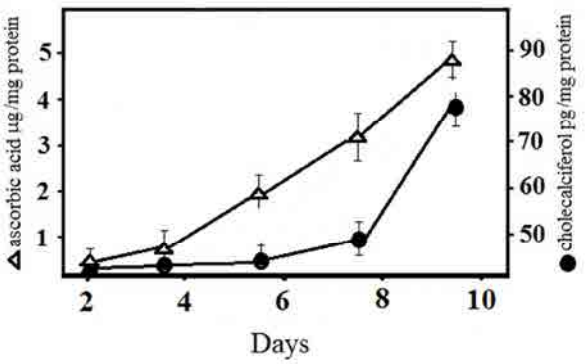


Figure 1. *Levels of ascorbic acid and cholecalciferol in perfused liver explants in the presence of CIZ. The value is the average of four determinations ± S.D.*

The liver explants were perfused with the serum-free medium supplemented with 15% CIZ, while the control group was treated with 15% sucrose. Complete perfusion medium was changed every 2 days and aliquots were collected throughout the experiment. CIZ was obtained from CITOZEATEC, S.r.l. (Peschiera Borromeo, Milano, Italy). The main components of CIZ are as follows (units/100 g): 500 mg of vitamin C; 56 mg of vitamin B5; 56 µg of vitamin D; 3, 3 mg of vitamin B9; 222 mg of pyruvic acid; 120 mg of citric acid; 250 mg of tartaric acid and 77.8 g of carbohydrates.

2.3. Bioassays

The release of lactate dehydrogenase (LDH) from the liver into the medium, was considered as a marker of cell damage. Aliquots of the perfusion medium (1 mL) were collected every two days and tested for LDH. The test was performed using the Cyto Tox-ONETM homogeneous Membrane Integrity Assay Kit (Promega, Madison, USA). Detection of intracellular ROS levels was performed by using the cellular 2'7-dichlorodihydrofluorescin diacetate (DCFH-DA) assay, based on the description by Rushton and co-workers [6].

The fluorescence of the samples was read at λ590ex and λ560em. Evaluation of the levels of two representative CIZ components in cultured liver explant was carried out

analyzing the amount of ascorbic acid and cholecalciferol (Figure 1), as markers, in aliquots of the parenchyma of liver explant by HPLC methods [7, 8].

2.4. Histopathological and Immunohistochemical Analyses

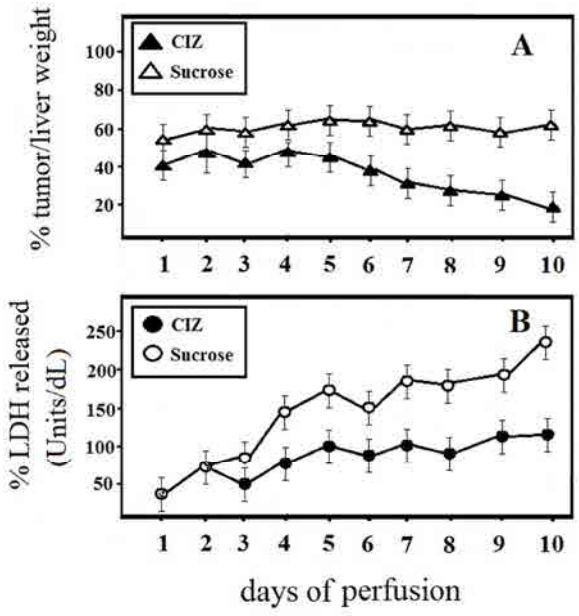


Figure 2. *A. Decrease of tumor/liver weight percentages, during the treatment of liver explants, with 15% CIZ as reported in Material and Methods. B. Levels of LDH released from perfused explants as a marker of cell damage. The values are the average of two determinations ± S.D.*

During the 10 days of perfusion, paraffin-embedded sections of biopsies of explanted livers were prepared by using routine procedures, for histopathological and immunohistochemical examinations. Four µm-thick sections of formalin-fixed and paraffin-embedded livers were prepared and stained with hematoxylin and eosin for histopathology. The multiplicity of hepatocellular lesions termed foci of cellular alteration, were assessed on a per unit area (/cm^2) basis and determined according to the criteria described by Frith *et al*. [9].

3. Results

It was possible to confirm that perfused liver explants, invaded by HCC, obtained from transplanted donors, are sufficiently viable for more than a week (10 days).

As already reported [2], two main components of CIZ (Vitamin C and D) are absorbed by the explants, in varying quantities. The weight of the liver explants plotted with the weight of the HCC mass, showed a 50% reduction of the total tumor volume, in samples perfused with 15% CIZ for 10 days (Figure 2A). Levels of LDH, released into the perfusion medium was rapidly increased in sucrose treated livers, while were lowered and maintained almost costant, during the 10 days of perfusion with CIZ, indicating the viability of liver explants (Figure 2B). Microscopic examination of the tumor tissues demonstrated that normal hepatic structures had been destroyed by invasion of cancer cells (data not shown).

Reactive oxygen species (ROS) play an important role in cancer growth. Although low levels of ROS can be beneficial, excessive accumulation can promote cancer [10].

Contrary to normal cells, cancer cells produce increased numbers of ROS with a strict dependence on an antioxidant defense system. ROS production plays pivotal roles in mediating endothelial cell apoptosis and regulating the development of atherosclerosis [11], while NADPH oxidase is a major source of vascular ROS production, and the enzyme complex of NADPH oxidases are considered a major source of superoxide anion formation [12]. In addition, NADPH oxidase is also heavily involved in endothelial apoptosis [13]. The presented results indicate that CIZ suppressed ROS production, which helps to elucidate the underlying mechanism for the antineoplastic effect of this multiple micronutrients supplement on HCC-invaded liver explants (Figure 3).

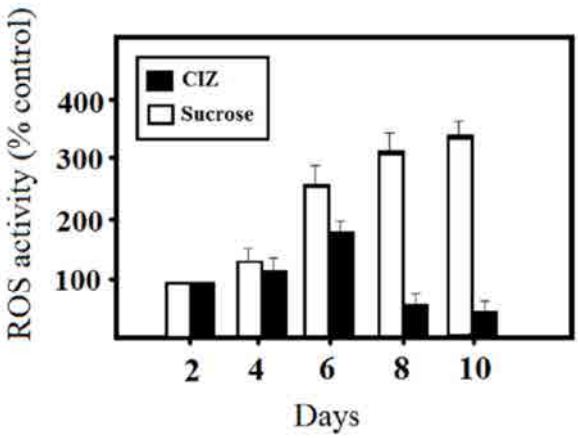


Figure 3. *Decrease of ROS activity percentages during the treatment of liver explants with 15% CIZ compared with the activity of controls as reported in Material and Methods, The values are the average of four determinations ± S. D.*

4. Discussion

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver tumour and represents more than 6% of all cancers. Although in recent years the therapeutic options for these patients have increased, clinical results are yet unsatisfactory and the prognosis remains dismal.

CIZ, which contains multiple active factors, is a micronutrients dietary supplement, proved useful in reducing the symptoms of various diseases, such as experimental liver steatosis and benign prostatic hyperplasia [14-15].

An antioxidant is a substance that delays, prevents or removes oxidative damage to a target molecule or a compound that directly scavenges ROS or indirectly acts to up-regulate antioxidant defenses or inhibit ROS production. The role of the reduction of oxidative stress, as the mechanism of action of many antitumor drugs, is acquiring an increasing interest [16]. In such cases, the antitumor therapy success, may be conditioned by the antioxidants present in the human body,

which can be endogenous or exogenous by nutritional supplements. Although, cells possess a large repertoire of enzymes and antioxidants, sometimes these agents are insufficient, to normalize the redox state produced by an intense oxidative stress. In these cases, exogenous antioxidant supplements may be required to restore the cell redox homeostasis.

It has been suggested that antioxidant supplementation may protect the development of certain diseases or that it may reverse the oxidative stress produced during their course. In the area of cancer, antioxidants are increasing in importance. Indeed, it has been reported that antioxidants can prevent cancer due to their effects on oxidative stress [17].

We have recently reported that CIZ, protected C57BL6/N mice from melanoma carcinogenesis, when chronically given before the initiation and promotion phases of melanoma cancer [1]. The various components of the CIZ, may act synergistically, amplifying the antioxidant and antineoplastic activity of molecules such as pyruvic acid, vitamins C (ascorbic acid), D3 (cholecalciferol), B5 (pantothenic acid) and B9 (folic acid) complex. The presented results, clearly indicate that CIZ suppressed ROS production in HCC-invaded liver explants, which are known to be involved in migration and invasion of cancer cells,. This evidence may provide a novel insight into the mechanisms underlying the antineoplastic activity of this multiple micronutrients supplements.

Acknowledgements

We are grateful to A.I.A.S. Italy, for financial support for studying the possibility of alternative therapies for cancer and Prof. Kisinawa for the kind gift of liver specimen as surplus of surgical tissues.

References

[1] Antonelli F. & Beninati S. Enhanced survival of B16-F10 melanoma tumour-bearing C57BL6/N mice treated with a mixture of antioxidants in: Recent Res Devel in Life Sci. 2011; 5: 51-60 Research Signpost, Trivandrum India

[2] Torricelli P, Antonelli F, Ferorelli P, De Martino A, Shevchenko A, and Beninati S. Organ culture model of liver for the study of cancer treatment for hepatocellular carcinoma. Cancer Res J. 2016; 4 (2): 37-42.

[3] Kolev Y., Uetake H., Takagi Y., Sugihara K. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1α) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. Annals of Surgical Oncology. 2008; 15 (8): 2336–2344.

[4] F. Pons, M. Varela, and J. M. Llovet, Staging systems in hepatocellular carcinoma. HPB (Oxford). 2005; 7 (1): 35–41.

[5] Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J. Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. Semin Liver Dis. 2010; 30 (1): 61-74.

[6] Rushton EK, Jiang J, Leonard SS, Eberly S, Castranova V, Biswas P, et al. Concept of assessing nanoparticle hazards considering nanoparticle dosemetric and chemical/biological response metrics. J Toxicol Environ Health A 2010; 73: 445–461.

[7] Moreno P, Salvadó V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A. 2000 870 (1-2): 207-215.

[8] Romero Rodriguez MA, Vazquez Oderiz ML, Lopez Hernandez J, Simal Lozano J. Determination of vitamin C and organic acids in various fruits by HPLC. J Chromatogr Sci. 1992; 30 (11): 433-437.

[9] Frith CH, Ward JM, Turusov VS. Tumours of the liver. IARC Sci Publ. 1994; (111): 223–69.

[10] Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. Cancer Lett. 2016, doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.042. [Epub ahead of print]

[11] Ying Wang, Ira Tabas. Emerging roles of mitochondria ROS in atherosclerotic lesions: causation or association? J Atheroscler Thromb. 2014; 21 (5): 381–390.

[12] O'Brien W J, Farhan Rizvi. NADPH oxidase expression and production of superoxide by human corneal stromal cells H. Mol Vis. 2009; 15: 2535–2543.

[13] Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. J Cell Biol. 2010; 191 (6): 1113–1125.

[14] Torricelli P., Ferorelli P., De Martino A., Antonelli F., Beninati S.. The Influence of Preventive Multiple Micronutrients Supplementation on Liver Steatosis in High- cholesterol Fed C57BL6/N Mice. American Journal of Life Sciences. 2013; 1 (2): 55-60.

[15] Torricelli P., Ferorelli P., De Martino A., Antonelli F. Beninati S.. Preventive Effects of A Mixture of Micronutrients with Antioxidative Properties on Experimentally Induced Prostate Hyperplasia, American Journal of Life Sciences. 2013; 1 (1): 22-26.

[16] Martínez ME, T. Jacobs E, Baron JA, Marshall JR, Byers TJ. Dietary Supplements and Cancer Prevention: Balancing Potential Benefits Against Proven Harms. Natl Cancer Inst. 2012; 104 (10): 732–739.

[17] Thanan R, Oikawa S, HirakuY, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. Int J Mol Sci. 2015; 16 (1): 193–217.

11

RIDUZIONE DEI R.O.S.

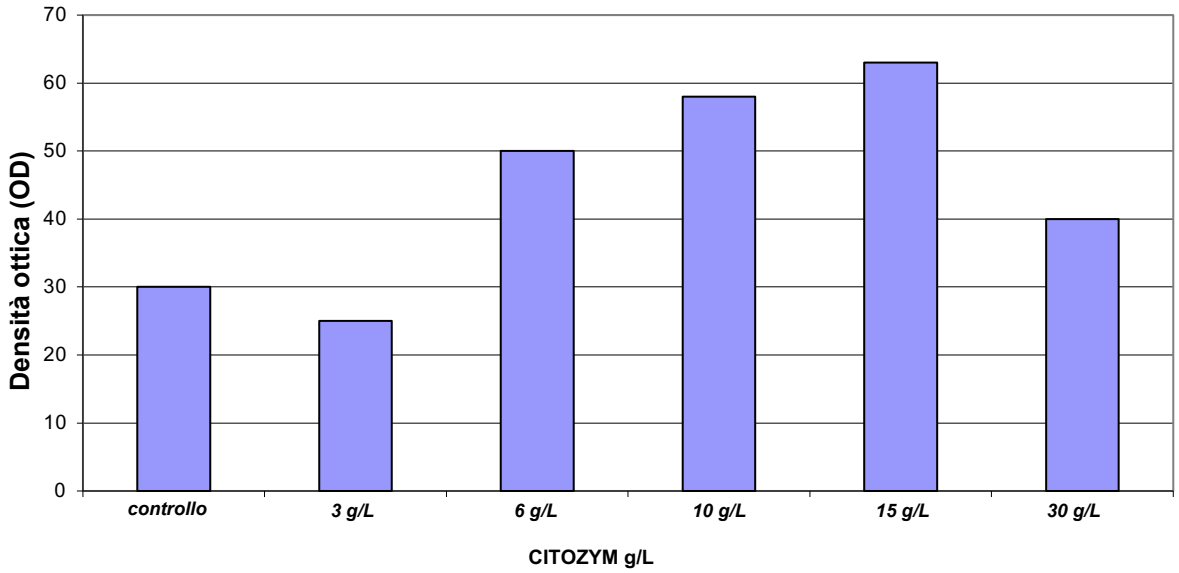
11 RIDUZIONE DEI R.O.S. - Ricerca Uniroma 2, Prof. Colizzi

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
LABORATORIO DI ONCOLOGIA SPERIMENTALE E ISTOLOGIA

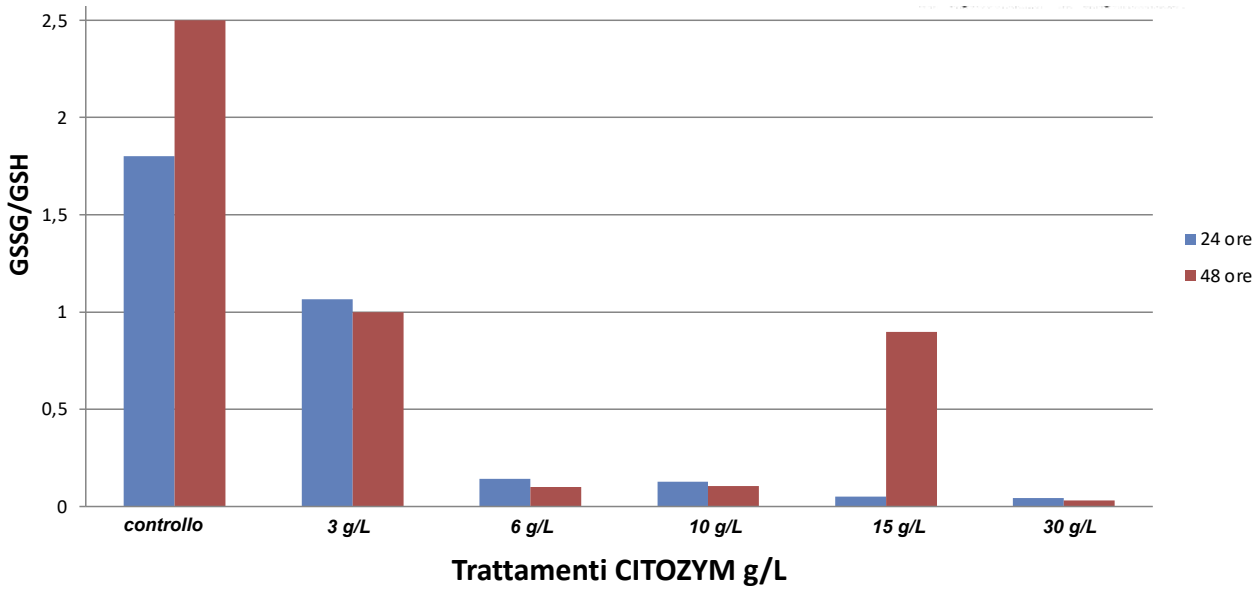
Presentazione a cura del Prof. Vittorio Colizzi, nell'ambito del Convegno Nazionale di Pallavolo Palarossini, Ancona, 2 ottobre 2010

NOTEVOLE RIDUZIONE DEI RADICALI LIBERI E AUMENTO DEGLI ENZIMI ANTIRADICALI

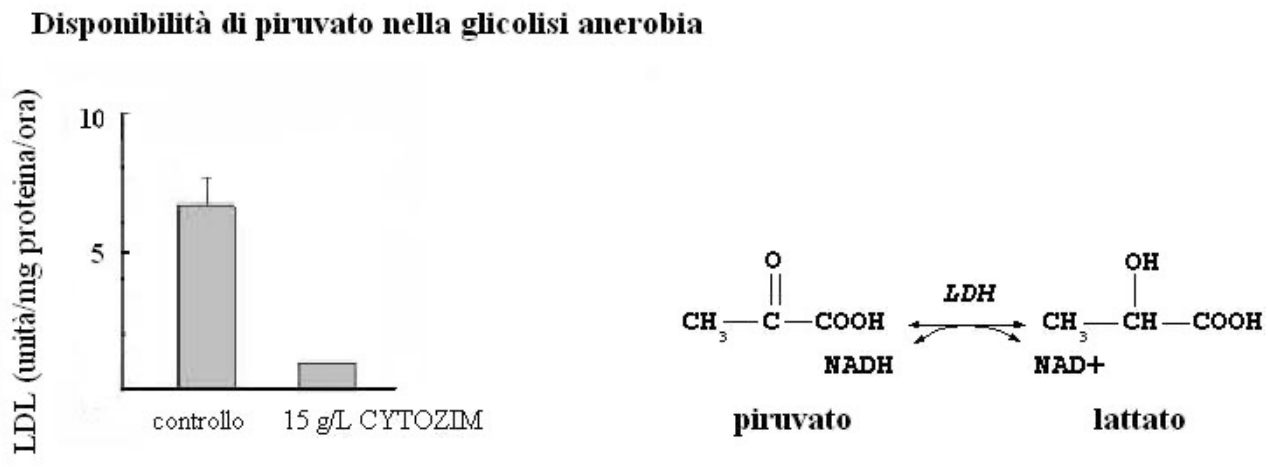
Attività Mitocondriale in cellule di muscolo striato (L8)



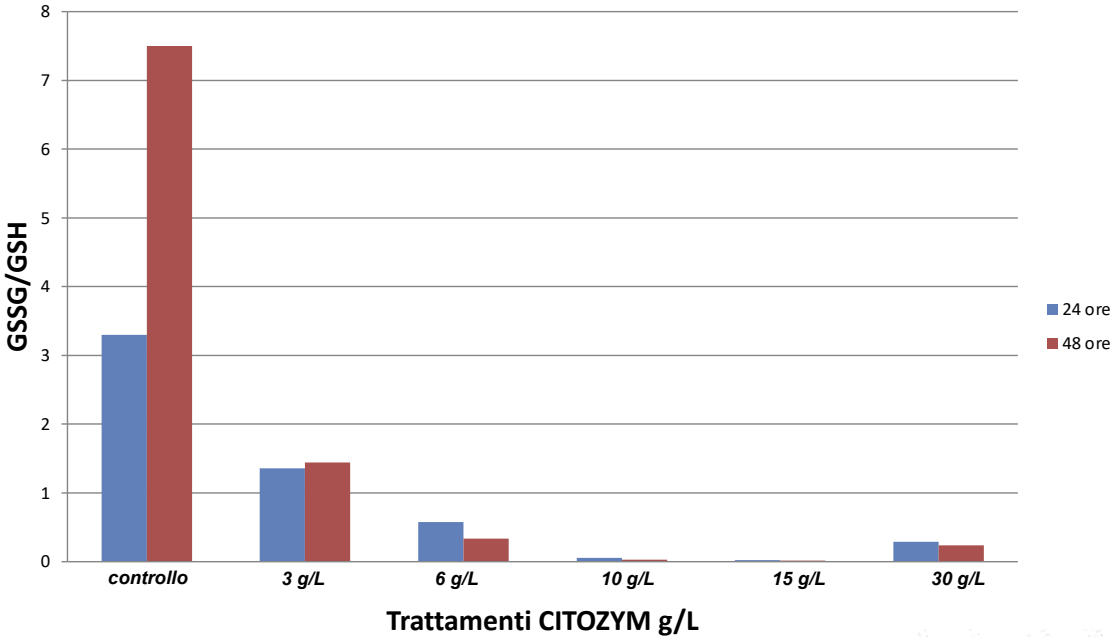
Livelli di stress ossidativo in cellule CHO (cavia)



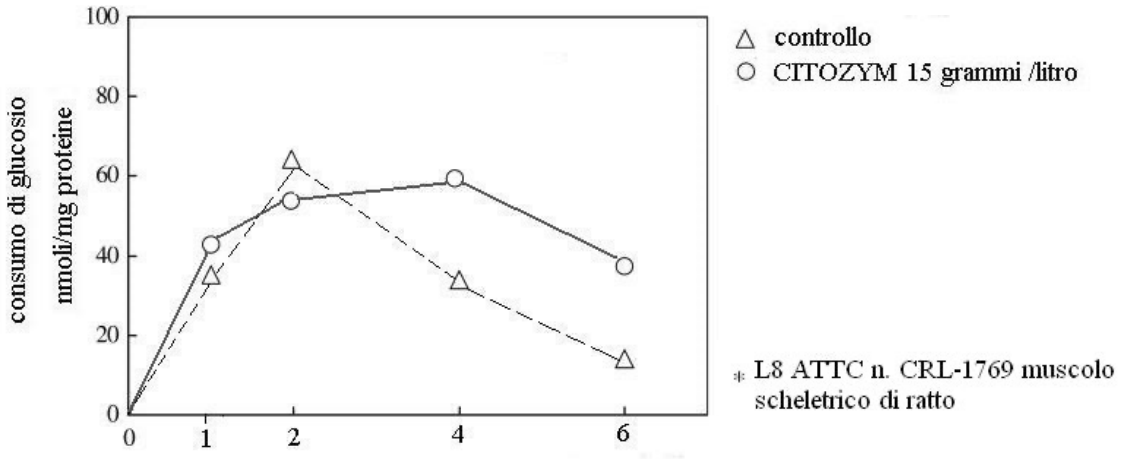
Disponibilità di piruvato per il catabolismo glucidico in cellule di muscolo striato (L8)

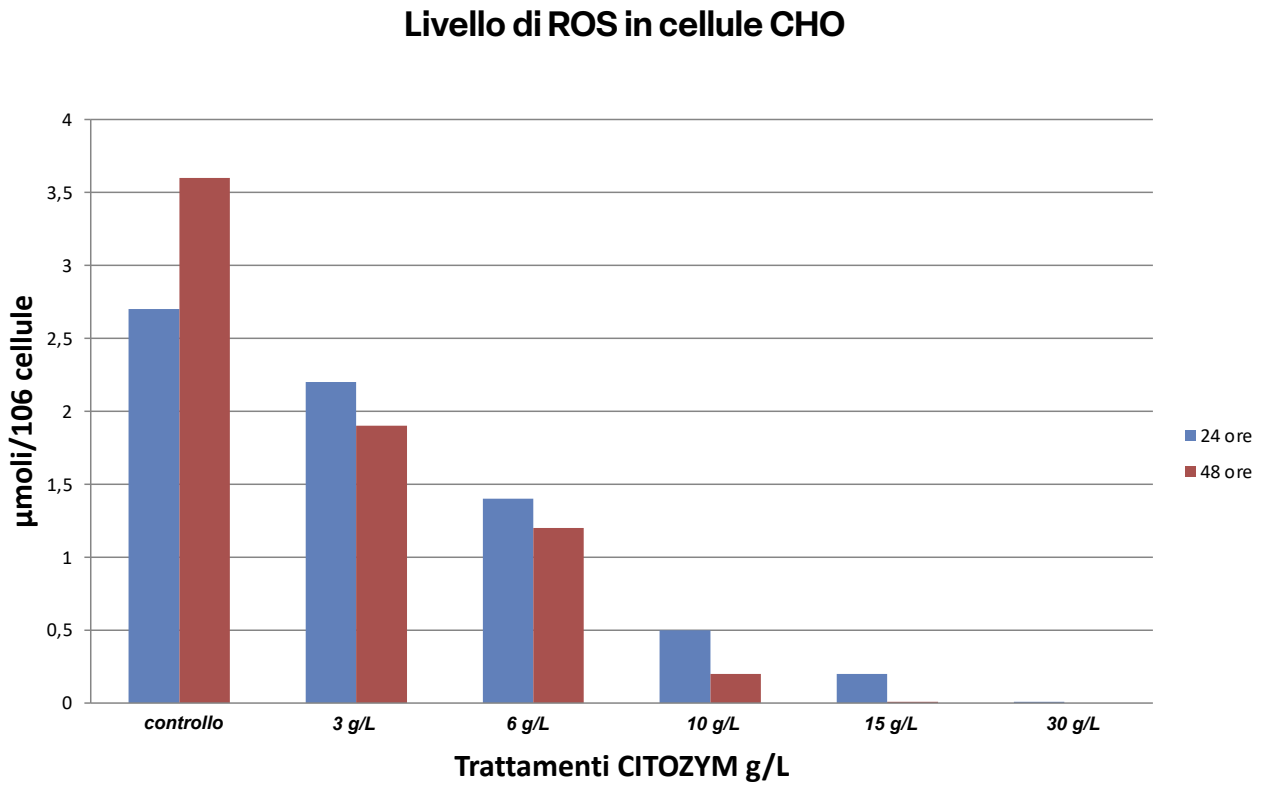


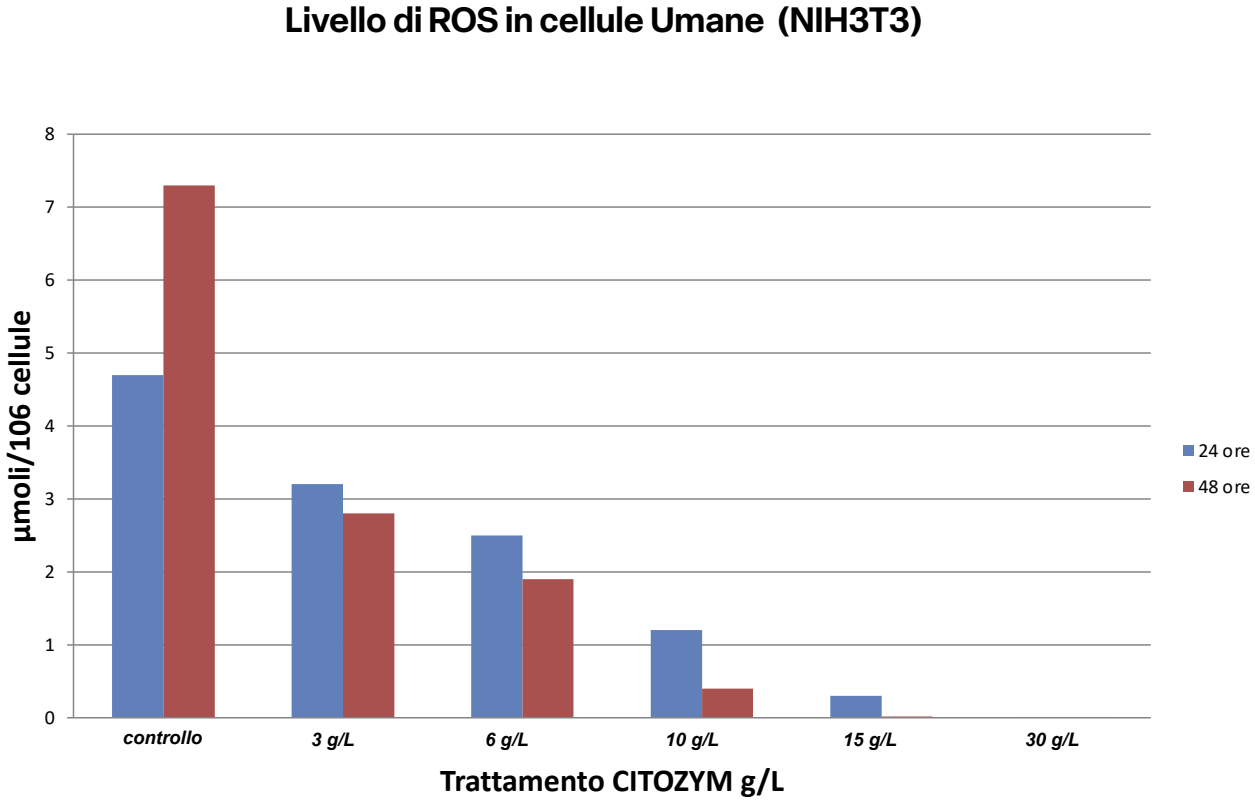
Livelli di stress ossidativo in cellule NIH3T3 (umane)

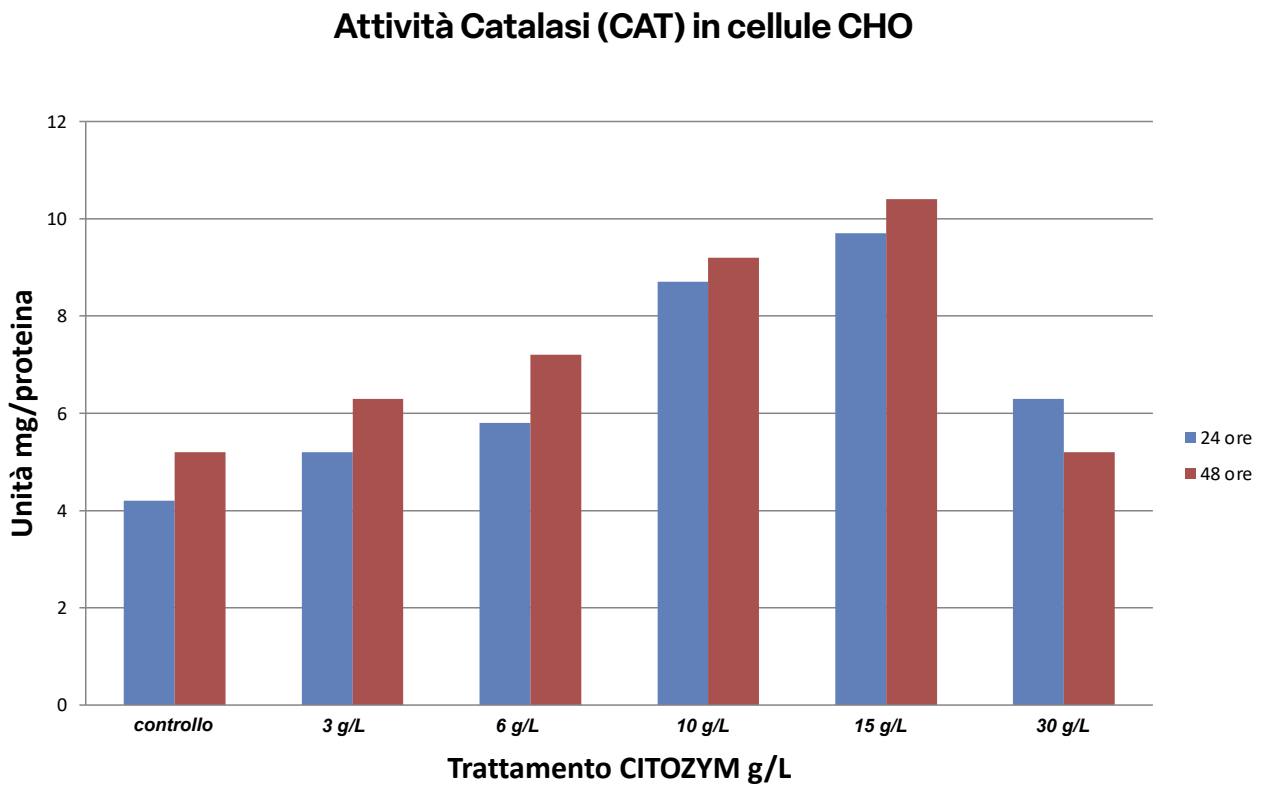


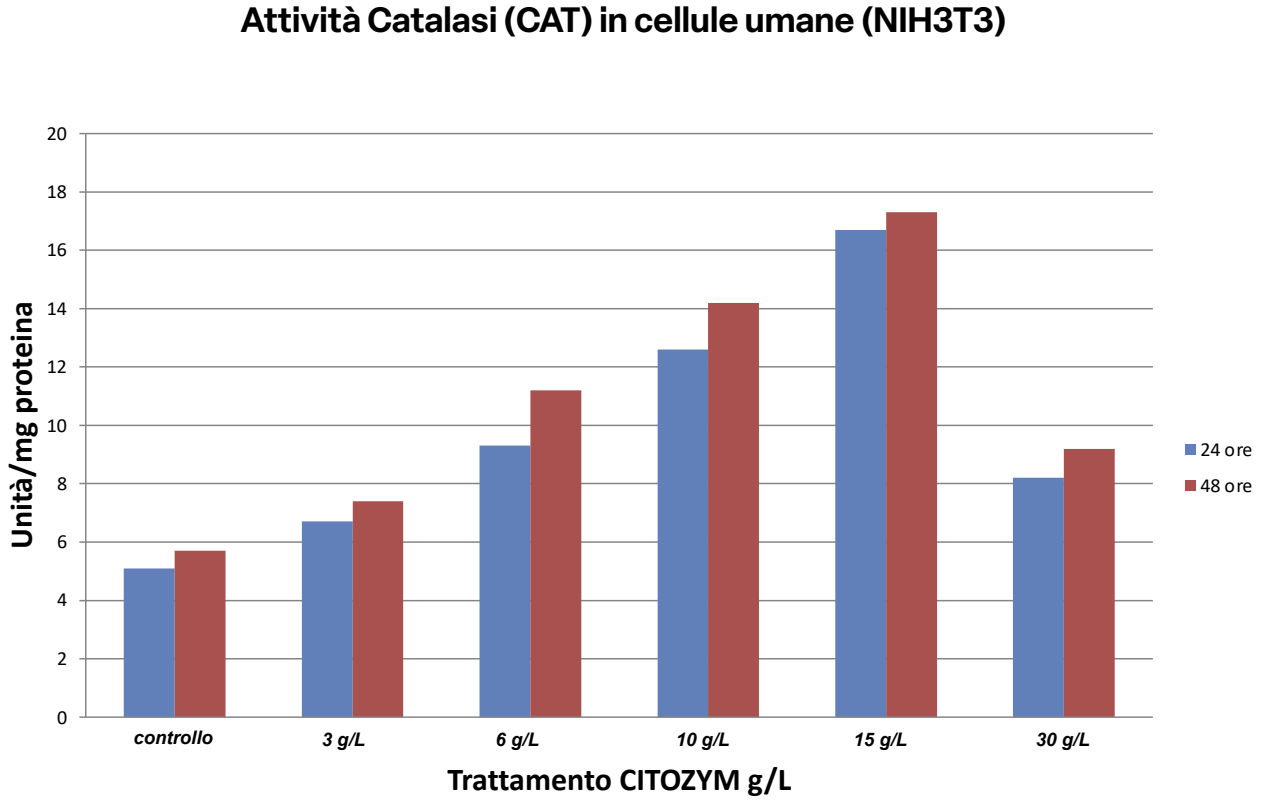
Aumentato consumo di glucosio in cellule di muscolo striato (L8*)



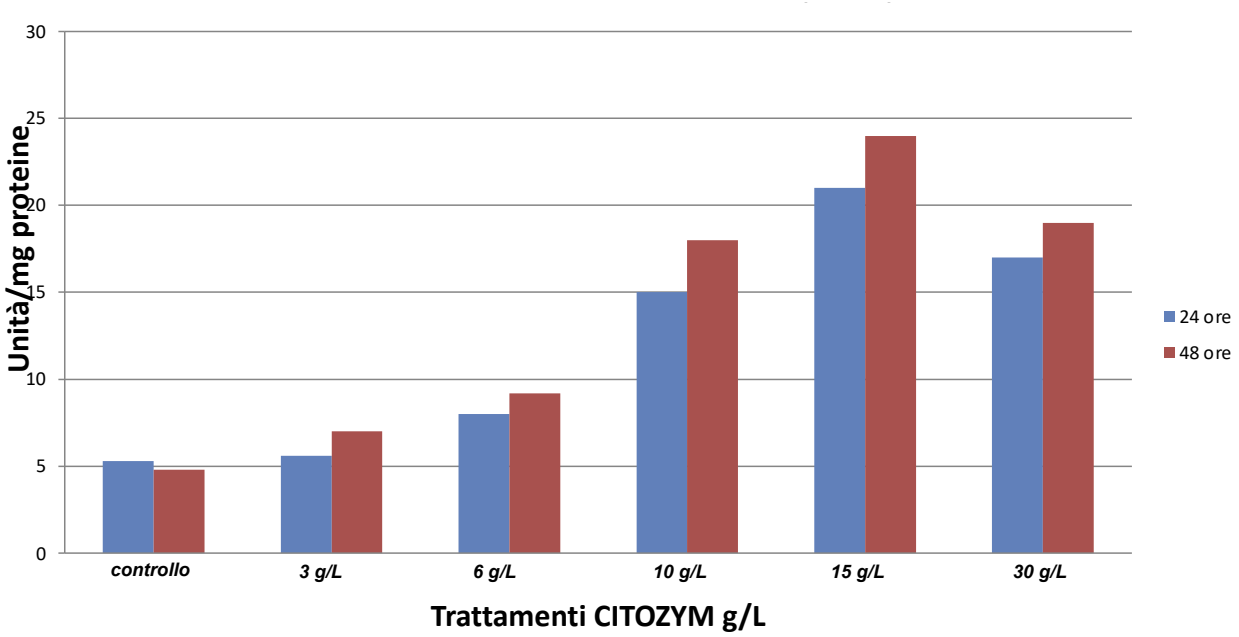

Livello di ROS in cellule CHO
µmoli/106 cellule
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
controllo
3 g/L
6 g/L
10 g/L
15 g/L
30 g/L
Trattamenti CITOZYM g/L
24 ore
48 ore


Livello di ROS in cellule Umane (NIH3T3)
µmoli/106 cellule
8
7
6
5
4
3
2
1
0
controllo
3 g/L
6 g/L
10 g/L
15 g/L
30 g/L
Trattamento CITOZYM g/L
24 ore
48 ore

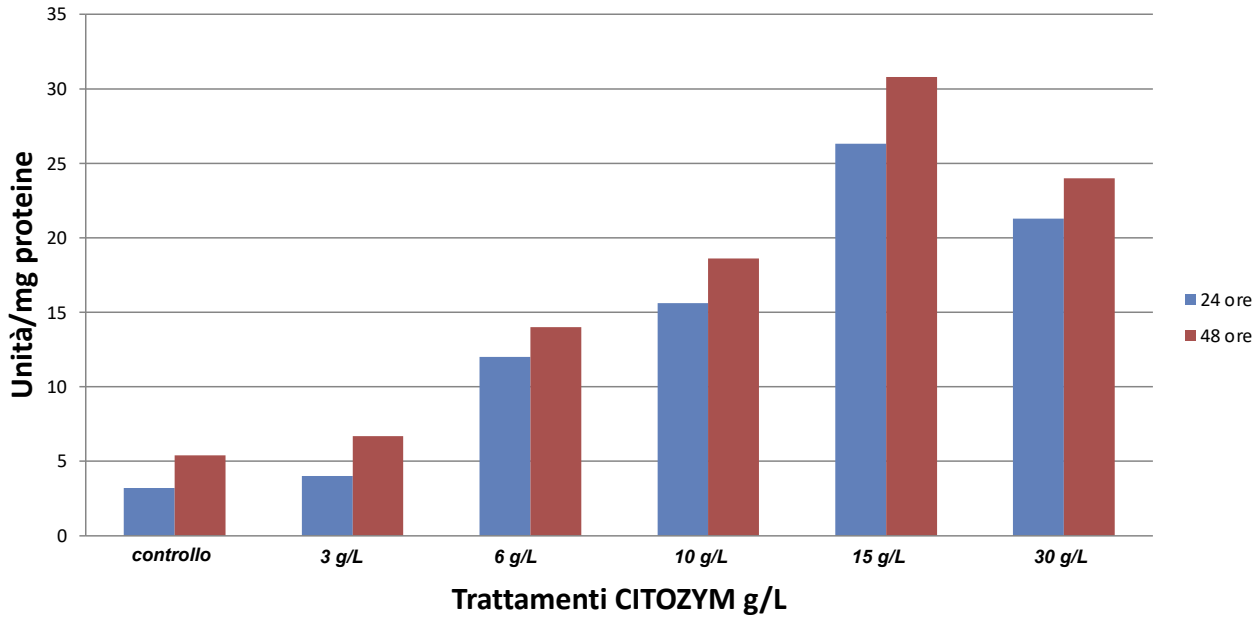

Attività Catalasi (CAT) in cellule CHO
Unità mg/proteina
0
2
4
6
8
10
12
controllo
3 g/L
6 g/L
10 g/L
15 g/L
30 g/L
Trattamento CITOZYM g/L
24 ore
48 ore


Attività Catalasi (CAT) in cellule umane (NIH3T3)
Unità/mg proteina
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
controllo
3 g/L
6 g/L
10 g/L
15 g/L
30 g/L
Trattamento CITOZYM g/L
24 ore
48 ore

Attività della SOD in cellule CHO (cavia)



Attività della SOD in cellule umane (NIH3T3)



12

ULCERE DA PRESSIONE

12.1 ULCERE DA PRESSIONE - Ricerca Uniroma 2

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Responsabile scientifico: prof. Dott. Beninati Simone

Citozym nel trattamento delle ulcere da pressione

Premessa: Il progetto di ricerca "Integratori Nutrizionali e Patologie Cellulari" finanziato dalla ditta Citozeatec srl e stato approvato in data 7 giugno 2022 dal Consiglio di Dipartimento della Facoltà di Scienze MFN dell'Università di Roma Tor Vergata. La prima parte del progetto ha avuto come soggetto di ricerca, il trattamento delle ulcere da pressione in pazienti trattati con CITOZYM®, un integratore nutrizionale prodotto dalla Citozeatec srl. La struttura del progetto è stata suddivisa in due fasi principali: **1.** Sperimentazione preliminare su cavie, al fine di saggiare non solo l'effetto del trattamento sia topico che sistemico di un integratore nutrizionale commerciale, ma soprattutto gli effetti sul possibile miglioramento della qualità della vita. **2.** I risultati di questa preliminare fase sperimentale hanno permesso di estendere il progetto su pazienti affetti da ulcere da pressione.
Il progetto è stato approvato da un comitato etico sia per la parte animale che umana.

Potenziale terapeutico di un integratore nutrizionale su un modello di ulcere da pressione cutanee nei topi

Sperimentazione preliminare su cavie

Topi maschi BALB/c (80), di età compresa tra 9 e 12 settimane, del peso di 200-300 g. sono stati alloggiati in un ambiente controllato (22 ± 2 °C, 60% di umidità relativa, 12 cicli luce/buio). Lo studio è stato condotto secondo le linee guida della Dichiarazione di Helsinki e approvato dal Comitato Etico del "Centro Servizi Interdipartimentale per la tecnologia animale" *(approvazione EK. 1921/2022, data di approvazione 27 aprile 2022)*. Gli animali acclimatati per 1 settimana, e nutriti con dieta calibrata e acqua a volontà, sono stati divisi in quattro gruppi di 20 individui ciascuno: (a) un gruppo di controllo non trattato; (b) un gruppo a cui sono stati somministrati 10 ml di CITOZYM® in 2 somministrazioni orali giornaliere (sistemico); (c) un gruppo a cui è stato applicato il CITOZYM® esclusivamente sulle ulcere sperimentali per tre volte al giorno (topico) e (d) un gruppo che ha ricevuto 10 ml di CITOZYM® in 2 dosi orali al giorno e è stato applicato il CITOZYM® alle ulcere sperimentali tre volte al giorno (Sistemico + Topico). Gli effetti del CITOZYM® sono stati esaminati ogni 10 giorni su 20 animali per gruppo (40 ulcere per gruppo), per 30 giorni di trattamenti totali. Per evitare sofferenze inutili agli animali da esperimento, un totale di 80 topi sono stati divisi in 4 gruppi di 20 individui ciascuno. Ciascuno dei 4 gruppi è stato a sua volta suddiviso in 4 gruppi da 5 animali. In questo modo sono stati effettuati controlli sui campioni non trattati a 0, 10, 20 e 30 giorni. Il confronto tra i vari gruppi ha una maggiore significatività statistica.

Risultati

Test sugli animali

Per la sperimentazione animale sono state considerate le direttive introdotte dalla Comunità Europea in merito ai "metodi alternativi". L'innovazione introdotta dalla Direttiva 2010/63/UE e recepita con il D.Lgs. n. 26 del 4 marzo 2014 riguarda lo sviluppo, la validazione, l'accettazione e l'applicazione

dei “metodi alternativi”, un nuovo approccio che ha segnato un miglioramento nel campo della sperimentazione animale. I topi maschi BALB/c per il nostro progetto sperimentale, non sono stati sacrificati al termine della sperimentazione e sono stati opportunamente anestetizzati durante tutti i trattamenti. I topi BALB/c non hanno mostrato alcuna perdita di peso corporeo e hanno mantenuto un tasso di sopravvivenza del 100% durante il periodo sperimentale. Per le analisi biochimiche, i micro frammenti di tessuto della lesione sono stati raccolti dopo anestesia locale con spray di lidocaina al 15% e congelati a -70° C [24].

Modello di lesione indotta delle ulcere da pressione

Gli animali sono stati anestetizzati per via intraperitoneale con ketamina (120 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e la loro schiena è stata rasata. L’epidermide, il derma e l’ipoderma sono stati sollevati e inclusi tra una coppia di dischi magnetici, secondo una metodologia riportata in letteratura. La superficie dei dischi è circolare con un diametro di 12 mm e il peso è di 2,5 g. È stato eseguito un periodo completo d’ischemia e riperfusione per ottenere un’ulcera da pressione.

Valutazione delle dimensioni delle ulcere sperimentali e loro riepitelizzazione

Al termine di ogni trattamento è stata eseguita una valutazione preliminare dell’area della ferita e dell’indice di riepitelizzazione. L’area superficiale delle lesioni è stata misurata regolarmente utilizzando un calibro con topi sottoposti a leggera anestesia per inalazione con isoflurano (Piramal Healthcare). La superficie della ferita è stata valutata misurando l’asse maggiore (a) e minore (b) di ciascuna ferita e calcolata la superficie in cm2, utilizzando la formula:

$$[\pi \times (a/2 \times b/2)]$$

Per valutare la riepitelizzazione, i margini dell’area della ferita non riepitelizzata e l’area totale della ferita sono stati misurati 10, 20 e 30 giorni dopo il protocollo di trattamento nutrizionale e confrontati con il controllo come riportato in letteratura. La riepitelizzazione completa era evidente quando il tessuto epiteliale neoformato copriva il 95%-100% dell’area della ferita. I dati ottenuti sono stati quindi analizzati utilizzando il software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). I risultati sono espressi come percentuale dell’area della ferita riepitelizzata nel corso del tempo di trattamento e indicati come indice di riepitelizzazione (RE cm2/die). Per valutare la contrazione della ferita, l’area della ferita è stata misurata immediatamente dopo l’applicazione di CITOZYM® (giorno 0) e 10, 20 e 30 giorni dopo, come descritto in precedenza. I risultati sono stati poi espressi, come percentuale dell’area, rispetto a quella della ferita originaria. Se non vi erano segni di riepitelizzazione e la ferita rimaneva completamente aperta, non era assegnato alcun punto per il parametro RE. La sensibilità complessiva per questo parametro è stata del 92% (233 punti dati) durante la fase di validazione di questo studio su tutti i modelli di ferita.

Analisi biochimiche

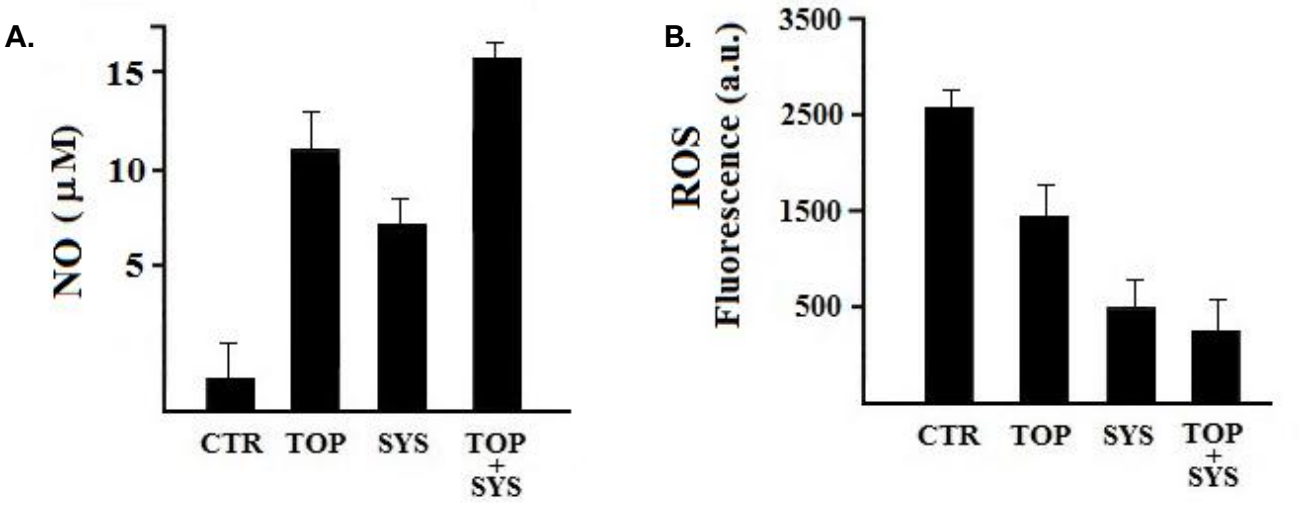
Al fine di poter saggiare la capacità antiossidante del trattamento sono stati valutati i livelli di specie reattive dell’ossigeno quali: specie reattive dell’ossigeno (ROS), ossido nitrico (NO), e superossido dismutasi (SOD). Altre determinazioni biochimiche hanno coinvolto fattori di crescita quali le poliammine e l’enzima deputato alla loro sintesi, l’ornitina decarbossilasi (ODC). Anche la transglutaminasi tissutale (TG2) un enzima principale candidato per la stabilizzazione dei tessuti durante la guarigione delle ferite, che catalizza la sintesi dei legami incrociati covalenti Υ-glutamil-epsilon-lisina tra le proteine della matrice extracellulare.

ROS e NO.

La segnalazione Redox è un regolatore fondamentale nel processo di guarigione delle ferite. Un aumento dei ROS nella cellula potrebbe portare a un’ossidazione inappropriata del DNA, delle

proteine e dei lipidi, che condurre alla perdita di funzione e potenzialmente a un ulteriore aumento dei livelli di ROS. Per regolare i livelli di ROS nella cellula, si sono evoluti meccanismi antiossidanti. Livelli eccessivi di ROS e il conseguente stress ossidativo occorrono se la produzione di ROS aumenti e/o quando gli antiossidanti sono esauriti. La somministrazione di CITOZYM® modula la sintesi di ROS e NO e riduce il danno ossidativo nelle ulcere da pressione sperimentali.
L'azione positiva dell'ossido nitrico (NO) nella guarigione delle ferite ha focalizzato l'attenzione della ricerca sulla terapia curativa basata su NO.L'NO gioca un ruolo fondamentale in vari processi di guarigione delle ferite, tra cui la risposta infiammatoria, la proliferazione cellulare, la formazione di collagene, l'azione antimicrobica e l'angiogenesi. Nelle ulcere da pressione, la riperfusione provoca danno tissutale e necrosi principalmente a causa della sintesi esacerbata di ROS e NO.
Il trattamento con CITOZYM® è stato in grado di ridurre il danno ossidativo indotto dalla presenza di ferite cutanee nei topi (***Figura 1***). È stato valutato se la somministrazione di CITOZYM® per applicazione topica o sistemica o entrambe potesse influenzare la sintesi di ROS, NO e quindi il danno ossidativo. I livelli di NO a 30 giorni, erano aumentati dopo l'ulcerazione nei topi trattati, ma erano ridotti nel gruppo di controllo non trattato (***Figura 1 A***). I livelli di ROS erano aumentati dopo l'ulcerazione, ma diminuivano drasticamente dopo i trattamenti (***Figra 1 B***). I dati appaiono positivi, considerando che l'NO gioca un ruolo fondamentale in vari processi di guarigione delle ferite, tra cui la risposta infiammatoria, la proliferazione cellulare, la formazione di collagene, l'azione antimicrobica e l'angiogenesi.

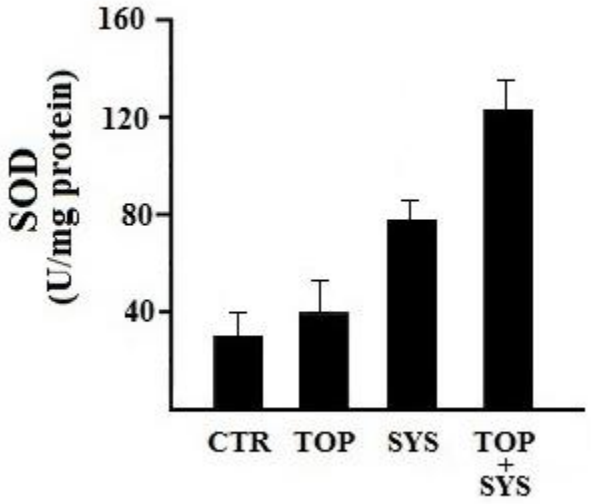
Figura 1



SOD.

Le SOD costituiscono la prima linea di difesa contro i danni mediati dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Il superossido è uno dei principali agenti ossidanti nella cellula e di conseguenza la SOD ha un ruolo antiossidante chiave. L'attività della SOD, è aumentata significativamente dopo trenta giorni di trattamento combinato con CITOZYM® (TOP+SYS), rispetto al controllo non trattato. Anche i singoli trattamenti, sia topico che sistemico, hanno evidenziato un significativo incremento a 30 giorni (***Figura 2***). Considerando che la SOD costituisce una difesa antiossidante molto importante contro lo stress ossidativo nell'organismo, i dati appaiono positivi. Presi insieme, questi dati suggeriscono che il trattamento con CITOZYM® potrebbe causare l'aumento intracellulare del perossido di ossigeno da parte dei radicali dell'ossigeno attraverso l'aumento dell'attività SOD. L'enzima agisce come un buon agente terapeutico contro le malattie mediate da specie reattive dell'ossigeno. In conformità a questi risultati, il CITOZYM® sembra essere un potente antiossidante in quasi tutte le cellule esposte all'ossigeno.

Figura 2

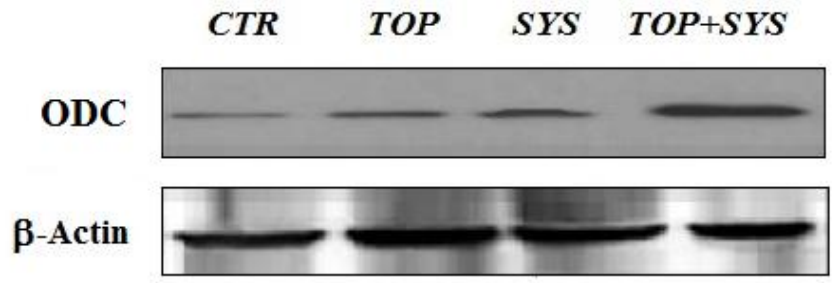


Espressione della proteina ODC.

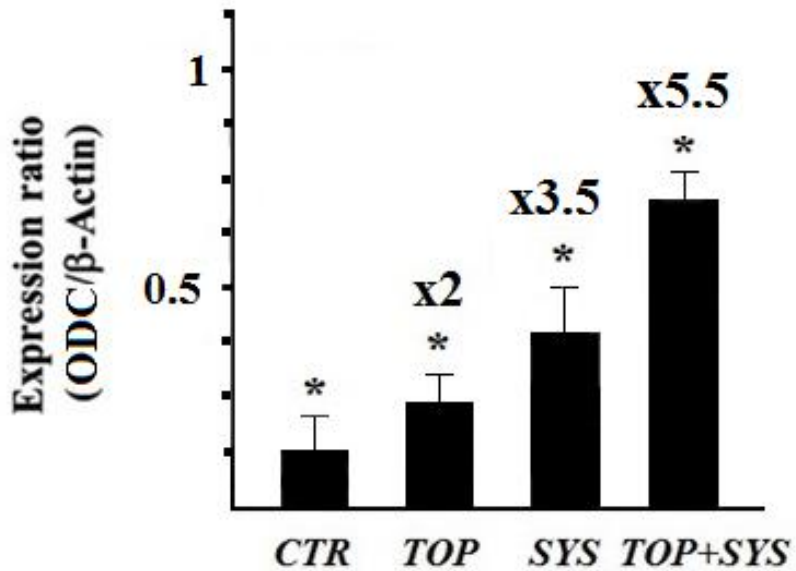
Poiché i livelli di poliammine intracellulari sono correlati alla proliferazione cellulare (*Devens et al. 2000*), è stato testato se l'effetto del trattamento CITOZYM® delle ulcere sperimentali fosse associato a cambiamenti nell'espressione di ODC e quindi anche nei livelli di poliammina durante i 30 giorni di trattamento. Nelle ulcere di controllo, durante i 30 giorni di osservazione, l'espressione della proteina ODC non è cambiata in modo significativo (***Figura 3 A***). Al contrario, durante l'intero periodo di trattamento con CITOZYM®, sia esso TOP, SYS o combinato, è stato osservato un aumento graduale e costante dell'espressione della proteina ODC (***Figura 3***). Questa espressione enzimatica ha raggiunto un aumento di 2 volte nel trattamento TOP, più di 3 volte nel trattamento SYS e più di 5 volte nel trattamento combinato (***Figura 3 B***).

Figura 3

A.



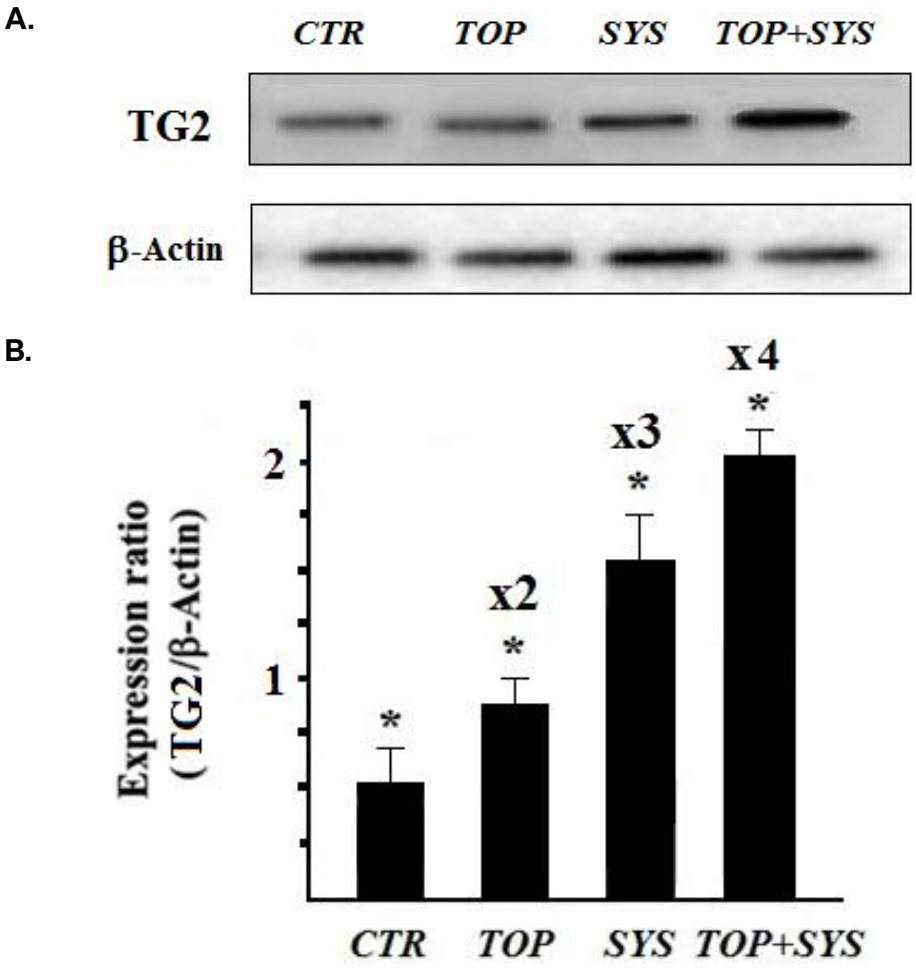
B.



Espressione e attività della proteina TG2.

Le transglutaminasi catalizzano la sintesi dei legami incrociati covalenti γ-glutamil-epsilon-lisina tra le proteine della matrice extracellulare e sono i principali candidati per la stabilizzazione dei tessuti durante la guarigione delle ferite. Pertanto, l'espressione temporo-spaziale dell'attività della transglutaminasi tissutale (TG2) è stata studiata nella pelle rigenerante di ulcere sperimentali sia di topi di controllo che di topi trattati con CITOZYM®. Nei campioni di tessuto prelevati da ulcere sperimentali, dopo 30 giorni di trattamento con CITOZYM®, i livelli di espressione di TG2 apparivano influenzati sia dai trattamenti TOP che da SYS rispetto ai controlli (***Figura 4***). In particolare, nel trattamento TOP il rapporto TG2/β-actina era doppio rispetto al controllo, mentre nel trattamento SYS raggiungeva un livello di tre volte e di 4 volte nel trattamento combinato TOP/SYS (***Figura 4 B***).

Figura 4



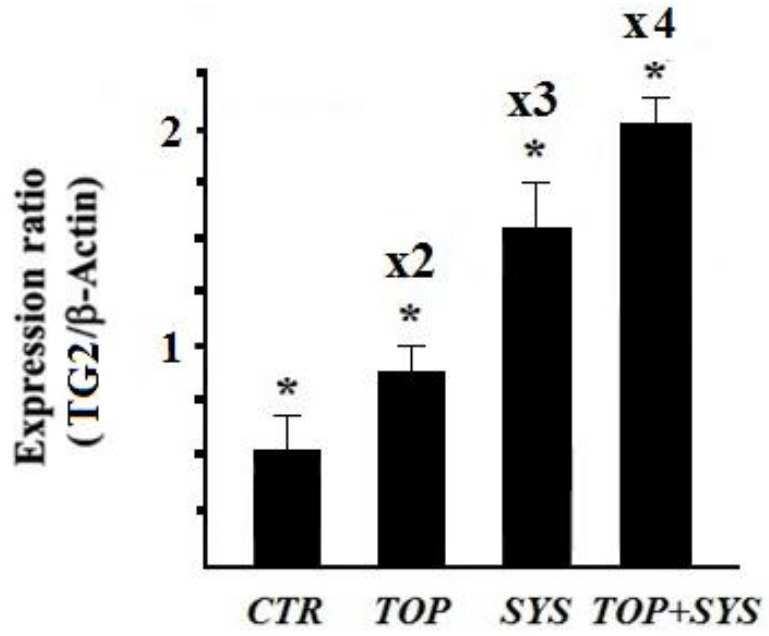
Attività del TG2.

La determinazione dell'attività della TG2 rappresenta uno dei metodi per valutare la differenziazione delle cellule epidermiche (Condello et al. 2008). L'attività di questo enzima nelle ulcere da pressione trattate per 30 giorni con CYZ è mostrata nella ***Figura 4 A***.

Il trattamento topico, rispetto al controllo, ha indotto significativamente un potenziamento dell'attività delle TG2 del 22% e dell'86% con il trattamento sistemico.

Il trattamento combinato TOP+SYS ha evidenziato il raddoppio dell'attività enzimatica (***Figura 5***).

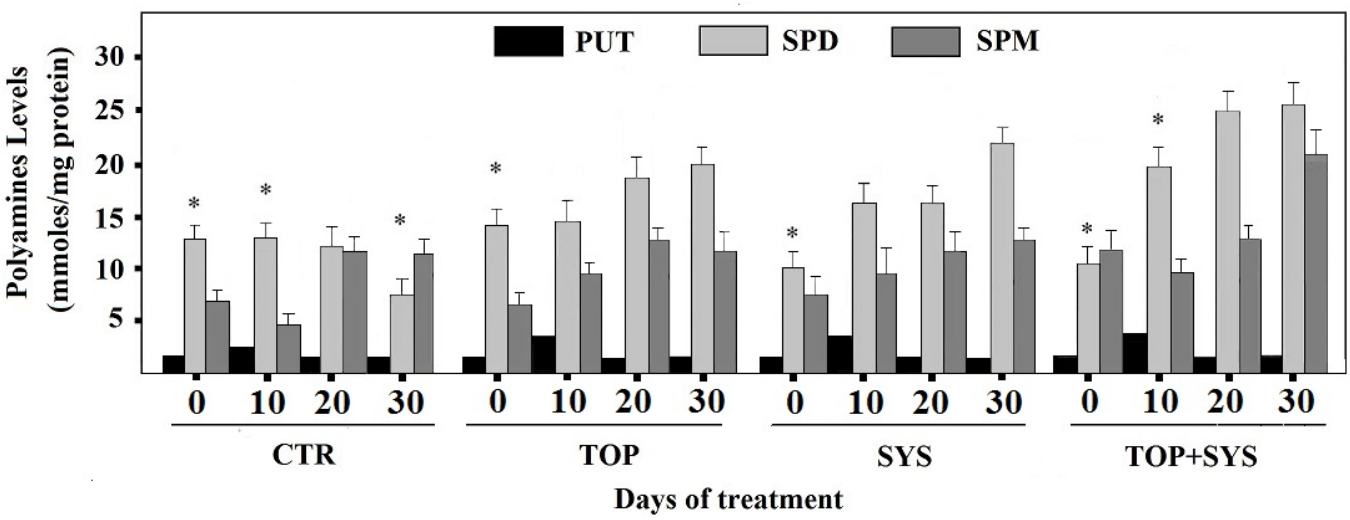
Figura 5



Poliammine libere

Nei campioni di tessuto prelevati dalle ulcere sperimentali, i livelli di spermidina (SPD) e spermina (SPM) libere apparivano influenzati sia dai trattamenti TOP che da quelli SYS rispetto ai controlli (***Figura 6***). Al contrario, la putrescina libera (PUT) non ha mostrato variazioni degne di nota durante l'intero periodo di osservazione. Nelle ulcere di controllo i livelli di SPM, dopo 30 giorni di osservazione, hanno mostrato un aumento di circa il 67% e quelli di SPD una riduzione della concentrazione di circa il 43%. Il trattamento TOP delle ulcere sperimentali per 30 giorni, ha mostrato un netto aumento della concentrazione sia di SPD (+42%) che, in misura maggiore, di SPM (+86%). Il trattamento con SYS a 30 giorni ha mostrato un aumento di circa due volte della concentrazione tissutale per SPD e del 75% per SPM. Il trattamento combinato TOP/SYS di 30 giorni ha mostrato quasi un raddoppio della concentrazione sia per SPD che per SPM (***Figura 6***). Nel loro insieme, i dati suggeriscono che il trattamento combinato (TOP+SYS) è stato più efficace nell'aumentare il livello complessivo di poliammine tissutali libere rispetto ai singoli trattamenti (TOP o SYS).

Figura 6



Riepitelizzazione e chiusura della ferita

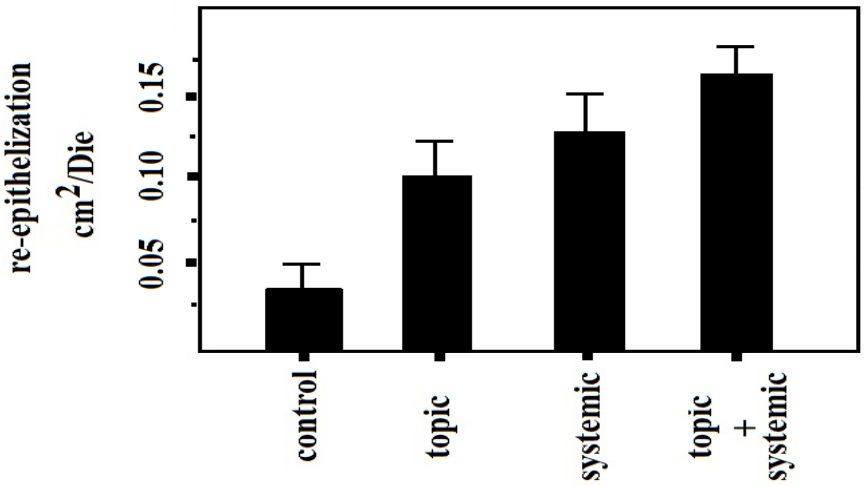
Un trattamento efficace delle ferite diabetiche richiede strategie che promuovono l'antinfiammazione, l'angiogenesi e la riepitelizzazione della ferita. L'eccessivo stress ossidativo nelle ulcere da pressione, inibisce la proliferazione cellulare e ostacola la tempestiva formazione vascolare e la polarizzazione dei

macrofagi da M1 proinfiammatorio a M2 antiinfiammatorio, determinando un ambiente infiammatorio persistente e una ferita che non guarisce.
Per la valutazione della riepitelizzazione e del tempo di chiusura della ferita l'area della ferita è stata fotografata in dieci topi selezionati casualmente ai giorni 0, 10, 20 e 30 dopo l'operazione. Queste immagini sono state utilizzate per calcolare la riepitelizzazione. L'area rimanente della ferita è stata analizzata tracciando il bordo della ferita sulle immagini e calcolando i dati dei pixel (*software ImageJ NIH, Bethesda, MD, USA*). La percentuale di chiusura della ferita è stata calcolata utilizzando l'equazione sottostante e il tempo di chiusura della ferita è stato determinato mediante l'osservazione quando la ferita era completamente chiusa.

$$\textbf{\% Chiusura della ferita} = \frac{\textbf{Area della ferita originale - Area della ferita effettiva}}{\textbf{Area della ferita originale}}$$

Tutti i risultati sono presentati come media ± deviazione standard (SD). La significatività statistica è stata determinata utilizzando un test t di Student non accoppiato in GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA) o ANOVA con il test post hoc Bonferroni. Un valore P inferiore a 0,5 ($P < 0,05$) è stato considerato statisticamente significativo. La guarigione della ferita è stata definita come riepitelizzazione completa entro 30 giorni dalla procedura o riepitelizzazione coerente per quattro settimane consecutive (***Figura 7***).

Figura 7



Discussione

L'invecchiamento negli organismi multicellulari è un processo biologico caratterizzato dal progressivo declino delle funzioni cellulari e da una diminuita capacità di rinnovamento dei tessuti, che porta a una ridotta capacità di contrastare lo stress ambientale. L'invecchiamento è controllato da diversi meccanismi eterogenei che coinvolgono fattori genetici, epigenetici e ambientali. Come ampiamente dimostrato dai dati della letteratura, l'invecchiamento ha una forte relazione con diverse condizioni patologiche, tra cui la sindrome metabolica, l'obesità, le malattie cardiovascolari, il cancro e le malattie neurodegenerative. È interessante notare che le patologie legate all'età sono strettamente associate ad un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e al conseguente stress ossidativo. In particolare, un gran numero di studi rileva il potenziale antiossidante dei composti naturali. Poiché lo stress ossidativo e l'infiammazione sono strettamente correlati ai processi fisiopatologici, qui, sulla base dell'ampia letteratura disponibile, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su un integratore alimentare con noti effetti antinfiammatori [Citozym®].

Figura 8

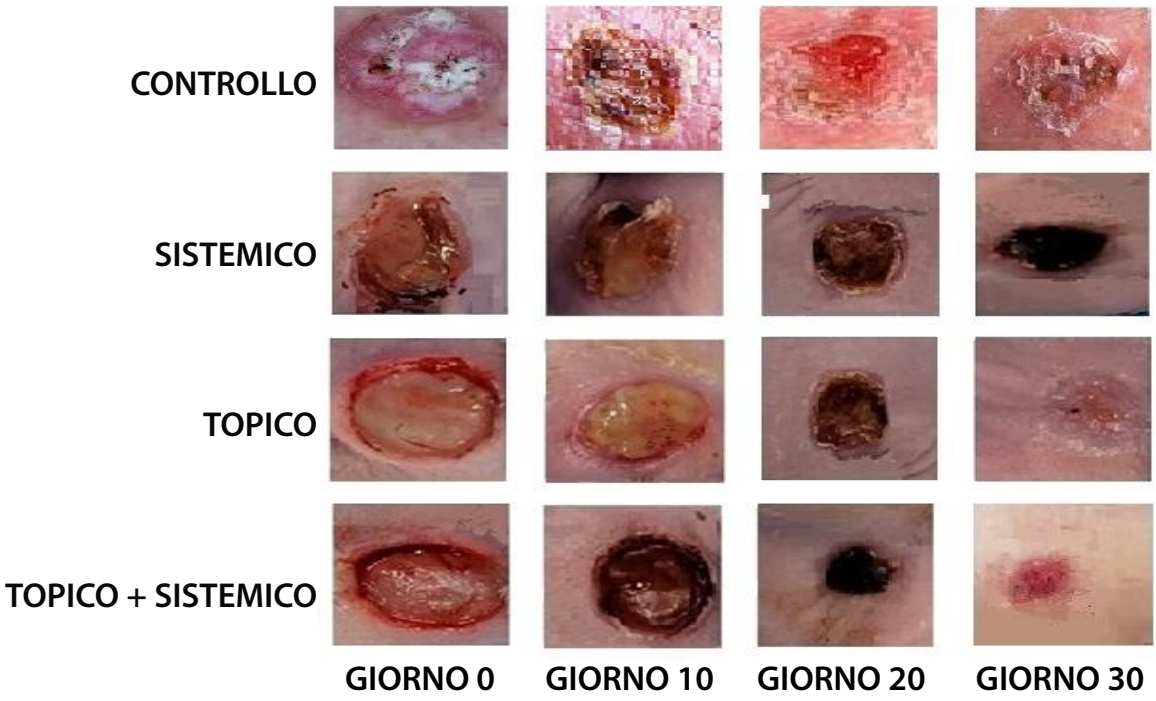
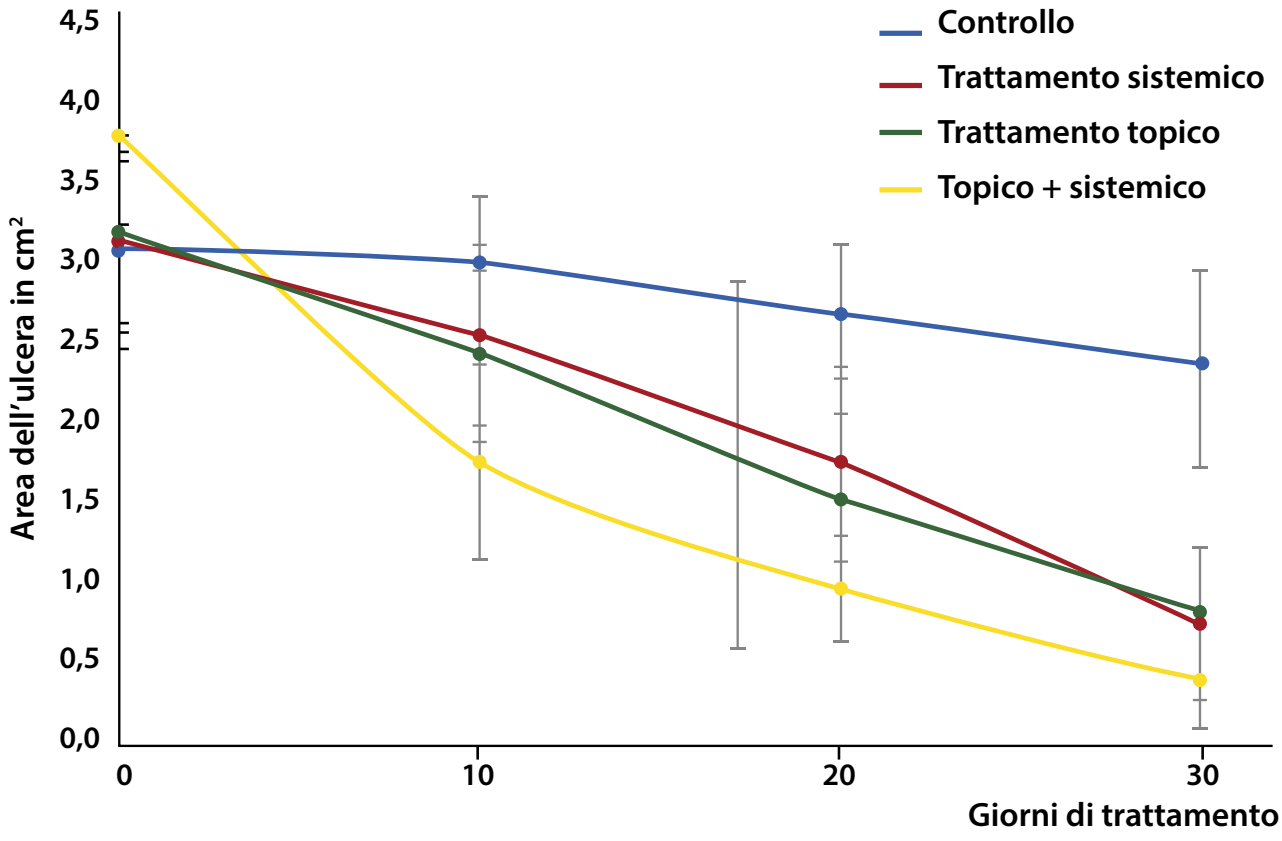


Figura 9. *Rappresentazione grafica della chiusura della ferita dopo i vari trattamenti, confrontati con il controllo non trattato*



Le ulcere da pressione rappresentano un problema debilitante soprattutto negli anziani immobilizzati. Queste ferite sono causate da sfregamento, da taglio e da pressione e sono particolarmente diffuse anche a causa della malnutrizione, recentemente riconosciuta come fattore chiave nel loro sviluppo.

La nutrizione gioca un ruolo chiave nella cura delle ulcere da pressione perché le ferite richiedono sia macronutrienti che micronutrienti per guarire. Il monitoraggio della progressione dell'ulcera nel tempo è un aspetto chiave per gli studi sperimentali che valutano l'efficacia di potenziali nuove terapie. Il presente studio mirava a valutare il potenziale ruolo di un'integrazione topica e sistemica di un integratore nutrizionale commerciale, ricco di vitamine e idrati di carbonio, nell'evoluzione delle ulcere da pressione in un modello di ulcere da pressione cutanee nei topi. L'accuratezza e la riproducibilità del modello sperimentale di ulcera cutanea è stata convalidata utilizzando un numero adeguato di topi maschi BALB/c, con misurazioni effettuate da gruppi di ricercatori indipendenti. I parametri morfometrici che valutavano la progressione della ferita nel tempo, includevano cambiamenti nell'area della ferita e l'indice di riepitelizzazione e l'indice di elevazione della cicatrice. Questi parametri sono stati associati alla determinazione di noti marcatori biochimici di riepitelizzazione (TG2, poliammine, ROS SOD e NO).

Un ruolo importante è attribuito ai fattori di crescita nello sviluppo, nella crescita e nella restituzione dopo la lesione dell'epidermide. La caratteristica comune dei fattori di crescita è la loro capacità di stimolare la crescita e la mitosi delle cellule quiescenti in un mezzo nutrizionalmente completo che di per sé non è sufficiente per avviare la divisione cellulare. Le poliammine sono composti non peptidici che promuovono la crescita presenti in tutte le cellule eucariotiche; sono state pubblicate anche le loro proprietà gastroprotettive e cicatrizzanti dell'ulcera. L'uso di alcuni fattori di crescita come terapia rigenerativa e angiogenica potrebbe aprire una nuova strada alternativa nella futura gestione dell'ulcera peptica. Le transglutaminasi creano legami incrociati covalenti di Ɣ-glutamil-ϵ-lisina tra le proteine della matrice extracellulare e sono i principali candidati per la stabilizzazione dei tessuti durante la guarigione delle ferite. Pertanto, abbiamo studiato l'espressione temporo-spaziale dell'attività della transglutaminasi nella pelle rigenerante di ulcere sperimentali sia di topi di controllo che di topi trattati con Citozym®. E' possibile concludere che il trattamento con l'integratore nutrizionale Citozym®, delle cavie trattate come descritto accelera la chiusura delle ulcere sperimentali, migliorando la qualità della vita e accelerando il processo di guarigione della ferita. I dati presentati saranno accuratamente applicati al successivo progetto di ricerca che sara' centrato sul trattamento delle ulcere da pressione in pazienti ospedalizzati.

Bibliografia

1. O'Donnell TF Jr, Passman MA, Marston WA, et al. Management of venous leg ulcers: clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery (R) and the American venous forum. J Vasc Surg. 2014;60(2 Suppl):3S-59S. [PubMed] [Google Scholar]

2. Lim CS, Baruah M, Bahia SS. Diagnosis and management of venous leg ulcers. BMJ. 2018;362:k3115. [PubMed] [Google Scholar]

3. Schneider C, Stratman S, Kirsner RS. Lower extremity ulcers. Med Clin North Am. 2021;105(4):663-679. [PubMed] [Google Scholar]

4. Lal BK. Venous ulcers of the lower extremity: definition, epidemiology, and economic and social burdens. Semin Vasc Surg. 2015;28(1):3-5. [PubMed] [Google Scholar]

5. Finlayson K, Wu ML, Edwards HE. Identifying risk factors and protective factors for venous leg ulcer recurrence using a theoretical approach: a longitudinal study. Int J Nurs Stud. 2015;52(6):1042-1051. [PubMed] [Google Scholar]

6. Finlayson K, Edwards H, Courtney M. Factors associated with recurrence of venous leg ulcers: a survey and retrospective chart review. Int J Nurs Stud. 2009;46(1078):1071-1078. [PubMed] [Google Scholar]

7. Renner R, Gebhardt C, Simon JC, Seikowski K. Changes in quality of life for patients with chronic venous insufficiency, present or healed leg ulcers. J Dtsch Dermatol Ges. 2009;7(11):953-961. [PubMed] [Google Scholar]

8. Cai PL, Hitchman LH, Mohamed AH, Smith GE, Chetter I, Carradice D. Endovenous ablation for venous leg ulcers. Cochrane Database Syst Rev. 2023;7(7):CD009494. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

9. Kirsner RS, Vivas AC. Lower-extremity ulcers: diagnosis and management. Br J Dermatol. 2015;173(2):379-390. [PubMed] [Google Scholar]

10. Barwell JR, Davies CE, Deacon J, et al. Comparison of surgery and compression with compression alone in chronic venous ulceration (ESCHAR study): randomised controlled trial. Lancet. 2004;363(9424):1854-1859. [PubMed] [Google Scholar]

11. Chan SSJ, Yap CJQ, Tan SG, Choke ETC, Chong TT, Tang TY. The utility of endovenous cyanoacrylate glue ablation for incompetent saphenous veins in the setting of venous leg ulcers. J Vasc Surg Venous Lymphat Disord. 2020;8(6):1041-1048. [PubMed] [Google Scholar]

12. Yamamoto K, Miwa S, Yamada T, et al. A strategy to enable rapid healing and prevent recurrence of venous ulcers. Wounds. 2022;34(4):99-105. [PubMed] [Google Scholar]

13. Dahm KT, Myrhaug HT, Stromme H, Fure B, Brurberg KG. Effects of preventive use of compression stockings for elderly with chronic venous insufficiency and swollen legs: a systematic review and meta-analysis. BMC Geriatr. 2019;19(1):76. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

14. Behairy AS, Masry SE. Impact of educational nursing intervention on compression therapy adherence and recurrence of venous leg ulcers: a quasi-experimental study. Ocul Oncol Pathol. 2022;8(2):120-132. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

15. Bonkemeyer Millan S, Gan R, Townsend PE. Venous ulcers: diagnosis and treatment. Am Fam Physician. 2019;100(5):298-305. [PubMed] [Google Scholar]

16. Arksey H, O'Malley L. Scoping studies: towards a methodological framework. Int J Soc Res Methodol. 2005;8(1):19-32. [Google Scholar]

17. Tricco AC, Lillie E, Zarin W, et al. PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): checklist and explanation. Ann Intern Med. 2018;169(7):467-473. [PubMed] [Google Scholar]

18. Hong QN, Pluye P, Fàbregues S, et al. Mixed methods appraisal tool (MMAT) version 2018. Registration of copyright (#1148552). Canadian Intellectual Property Office, Industry Canada; 2018. [Google Scholar]

19. Milic DJ, Zivic SS, Bogdanovic DC, Lazarevic MV, Ademi BN, Milic ID. The influence of different sub-bandage pressure values in the prevention of recurrence of venous ulceration-a ten year follow-up. Phlebology. 2023;38(7):458-465. [PubMed] [Google Scholar]

20. Milic DJ, Zivic SS, Bogdanovic DC, Golubovic MD, Lazarevic MV, Lazarevic KK. A randomized trial of class 2 and class 3 elastic compression in the prevention of recurrence of venous ulceration. J Vasc Surg Venous Lymphat Disord. 2018;6(6):717-723. [PubMed] [Google Scholar]

21. Ashby RL, Gabe R, Ali S, et al. Clinical and cost-effectiveness of compression hosiery versus compression bandages in treatment of venous leg ulcers (venous leg ulcer study IV, VenUS IV): a randomised controlled trial. Lancet. 2014;383(9920):871-879. [PubMed] [Google Scholar]

22. Klonizakis M, Tew GA, Gumber A, et al. Supervised exercise training as an adjunct therapy for venous leg ulcers: a randomized controlled feasibility trial. Brit J Dermatol. 2018;178(5):1072-1082. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

23. Xin L, Jingfang J, Hua L, Shuyi L, Zhaoyu L. Application of lower extremity muscle training programin wound treatment of patients with venous ulcer of lower extremity. Milit Nurs. 2021;38(2):14-17. [Google Scholar]

24. Probst S, Sechaud L, Bobbink P, Skinner MB, Weller CD. The lived experience of recurrence prevention in patients with

venous leg ulcers: an interpretative phenomenological study. J Tissue Viability. 2020;29(3):176-179. [PubMed] [Google Scholar]

25. Zulec M, Rotar-Pavlic D, Puharic Z, Zulec A. "Wounds home alone" why and how venous leg ulcer patients self-treat their ulcer: a qualitative content study. Int J Env Res Pub He. 2019;16(4):559. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

26. Suehiro K, Morikage N, Harada T, et al. Self-care-based treatment using ordinary elastic bandages for venous leg ulcers. Ann Vasc Dis. 2017;10(3):229-233. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

27. Kapp S, Miller C. The experience of self-management following venous leg ulcer healing. J Clin Nurs. 2015;24(9–10):1300-1309. [PubMed] [Google Scholar]

28. Gonzalez A. Education project to improve venous stasis self-management knowledge. J Wound Ostomy Continence Nurs. 2014;41(6):556-559. [PubMed] [Google Scholar]

29. Van Hecke A, Grypdonck M, Beele H, Vanderwee K, Defloor T. Adherence to leg ulcer lifestyle advice: qualitative and quantitative outcomes associated with a nurse-led intervention. J Clin Nurs. 2011;20(3–4):429-443. [PubMed] [Google Scholar]

30. Alavi A, Sibbald RG, Phillips TJ, et al. What's new: management of venous leg ulcers: treating venous leg ulcers. J Am Acad Dermatol. 2016;74(4):627-640. [PubMed] [Google Scholar]

31. Weller CD, Richards C, Turnour L, Team V . Patient explanation of adherence and non-adherence to venous leg ulcer treatment: a qualitative study. Front Pharmacol. 2021;12:663570. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

32. Probst S, Allet L, Depeyre J, Colin S, Buehrer SM. A targeted interprofessional educational intervention to address therapeutic adherence of venous leg ulcer persons (TIEIVLU): study protocol for a randomized controlled trial. Trials. 2019;20(1):243. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

33. Coelho Rezende G, O'Flynn B, O'Mahony C. Smart compression therapy devices for treatment of venous leg ulcers: a review. Adv Healthc Mater. 2022;11(17):e2200710. [PubMed] [Google Scholar]

34. Qiu Y, Team V, Osadnik CR, Weller CD. Barriers and enablers to physical activity in people with venous leg ulcers: a systematic review of qualitative studies. Int J Nurs Stud. 2022;135:104329. [PubMed] [Google Scholar]

35. Kelechi TJ, Mueller M, Madisetti M, Prentice M. Efficacy of a self-managed cooling intervention for pain and physical activity in individuals with recently healed chronic venous leg and diabetic foot ulcers: a randomized controlled trial. J Wound Ostomy Continence Nurs. 2022;49(4):365-372. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

36. Kapp S, Prematunga R, Santamaria N. The "self-treatment of wounds for venous leg ulcers checklist" (STOW-V checklist V1.0): part 2-the reliability of the checklist. Int Wound J. 2022;19(3):714-723. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Roma, 03/03/2024

Il responsabile del progetto,
Prof. Simone Beninati



Iscrizione all'albo professionale ONB – AA083035

Biomedicines. 2024 Aug 22;12(8):1918. doi: 10.3390/biomedicines12081918

Potenziale terapeutico di un integratore biodinamico sulle ulcere da pressione cutanea: studio clinico randomizzato

Pasquale Ferorelli [1], Manfred Doepp [2], Stefano Lenzi [3], Roberto Rovelli [4], Gennaro Gisonna [1], Giuseppe Maierà [1], Francesco Antonelli [5], Massimo Radaelli [1], Anna Shevchenko [6], Giordana Feriotto [7], Carlo Mischiati [8], Ilaria Borromeo [9], Simone Beninati [9]

PMID: 39200385 PMCID: PMC11351901 DOI: 10.3390/biomedicines12081918

Abstract

Le ulcere da pressione (PU) sono una condizione debilitante e spesso dolorosa. Sono lesioni localizzate sulla pelle e/o sui tessuti sottostanti e sono comuni negli anziani, nelle persone con difficoltà motorie, nei diabetici, nelle malattie vascolari o nella malnutrizione, nonché in coloro che necessitano di cure intensive o palliative. La prevenzione e il trattamento delle UdP implicano strategie per ottimizzare l'idratazione, la circolazione e la nutrizione. La nutrizione gioca un ruolo chiave nella cura delle ulcere da pressione perché le ferite richiedono macronutrienti e micronutrienti per guarire. Le segnalazioni relative all'efficacia della "Terapia Enzimatica Complementare" anche in campo vulnologico ci hanno portato a questo studio, il cui scopo era quello di testare l'attività di un integratore alimentare biodinamico (Citozym®) ricco di carboidrati, vitamine, amilasi e lattasi e caratterizzato da spiccata attività antiossidante. Citozym® somministrato per via topica e/o sistemica, ed in particolare in entrambe le somministrazioni, in pazienti affetti da Pus, ha mostrato una marcata riduzione delle piaghe da decubito e, in molti casi, completa guarigione. Inoltre, è stato possibile osservare una minore incidenza di effetti collaterali rispetto alle terapie convenzionali. I risultati ottenuti, confermati da diversi test e riconosciuti dalla comunità scientifica, permettono di concludere che il trattamento con Citozym® potrebbe rappresentare una nuova ed efficace strategia per il trattamento delle UdP.

Parole chiave: terapia biodinamica; integratori alimentari; ulcere da pressione.

Fonti del testo completo

MDPI - Biomedicines
PubMed centrale

13.1 CERTIFICAZIONI INTERNAZIONALI

CERTIFICAZIONE ISO 9001 : 2015

Dal 2014, Citozeatec è un'azienda certificata ISO 9001 2015 relativa agli scopi di: ricerca, sviluppo e produzione di integratori alimentari.

PERRY JOHNSON REGISTRARS, INC.

Attestato di Certificazione

Perry Johnson Registrars, Inc., ha valutato il Sistema di Gestione Qualità di

Citozeatec S.r.l.
Sede Legale ed Operativa: Via Lambro, 7/8 - 20068 Peschiera Borromeo (MI) Italia

(In seguito denominata Organizzazione) e dichiara che
L'Organizzazione è conforme alla

ISO 9001:2015

Questa certificazione è relativa al seguente scopo

Ricerca, Sviluppo e Produzione di Integratori Alimentari.
IAF 13

Consultare il Campo di Applicazione documentato del Sistema di Gestione per la Qualità per i dettagli sui requisiti della Norma ISO 9001:2015 determinati come non applicabili.

La suddetta Organizzazione si impegna al rispetto delle regole a fronte delle quali è stata rilasciata la certificazione di cui al presente attestato.

PERRY JOHNSON REGISTRARS, INC. — UKAS MANAGEMENT SYSTEMS 0105

Terry Boboige, Presidente
Perry Johnson Registrars, Inc. (PJR)
755 West Big Beaver Road, Suite 1340
Troy, Michigan 48084
(248) 358-3388

Per informazioni puntuali e aggiornate circa eventuali variazioni intervenute nello stato della certificazione di cui al presente certificato, si prega di contattare il n. telefonico 0823/354874 o l'indirizzo e-mail italy@pjr.com.

L'uso del logo UKAS si riferisce alle attività di cui al Certificato di Accreditamento N. 0105

La validità del presente certificato dipende dall'esito positivo degli audit periodici di sorveglianza

Data di Prima Emissione:	*Data di Emissione Corrente:*	*Data di Scadenza:*	*Certificato N°*
28 maggio 2014	15 maggio 2023	27 maggio 2026	C2023-02460

13.2 CERTIFICAZIONI INTERNAZIONALI

REGISTRAZIONE FDA

Dal 2019, Citozeatec è presente nel registro FDA: Food and Drug Administration.



World Trade Customs Brokerage.

08/13/2019

We have reviewed the correspondence on behalf of:

Citozeatec SRL.

The FDA Food and Drug Administration Food Facility Registration Number is 12932524008

In Pursuant to the provision of the CFR 21 Code of Federal regulation these products regulated by the Food and drug Administration (FDA) and Pursuant to the requirement of the food and drug and cosmetic Act FD&C and the Fair Packaging and labeling Act (FLPA) and other related laws.

The Food and Drug Administration does not have the statutory authority to approve any or any food or Cosmetic, manufacturer or distributor of such product.

In the term "Dietary Supplement" appear as part of the statement of identity of Dietary Supplement. The products are in compliance with the term "Dietary Supplement" and are able to be sold in the U.S. Market.

The Dietary Supplement Citozeatec SRL is in full compliance with the regulations of the Food and Drug and Cosmetic Act FD&C and the Fair Packaging and labeling Act (FLPA) and other related laws.

This review of it ingredients and label has been done by World Trade Consultant Inc.

A licensed United States Customs House Broker.

Sincerely Yours,

Benny Diaz

President of World Trade Consultant Inc.

Citozeatec® srl
Ristampa: Novembre 2024

WEBSITE

Peschiera Borromeo (MI), Via Lambro, 7/8
Tel. 02 5530 5792 - servizioinformazioni@citozeatec.it