PROGETTO: CITOZYM NEL TRATTAMENTO DELLE ULCERE DA PRESSIONE

RESPONSABILE SCIENTIFICO: Prof. Dott. Beninati Simone

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 il 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 ℃, 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 (Fig. 1A). I livelli di ROS erano aumentati dopo l'ulcerazione, ma diminuivano drasticamente dopo i trattamenti (Fig. 1B). 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.

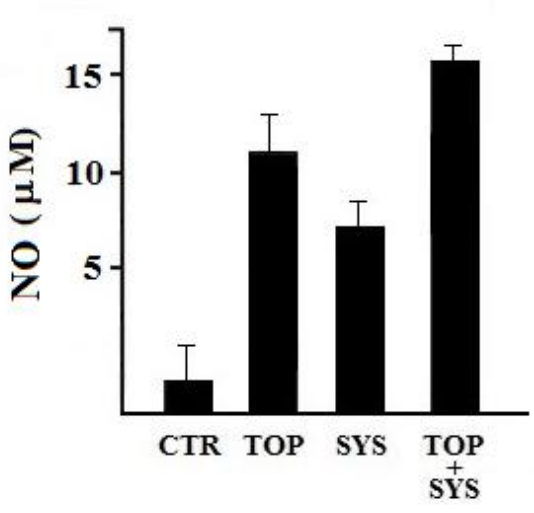


Figure 1A

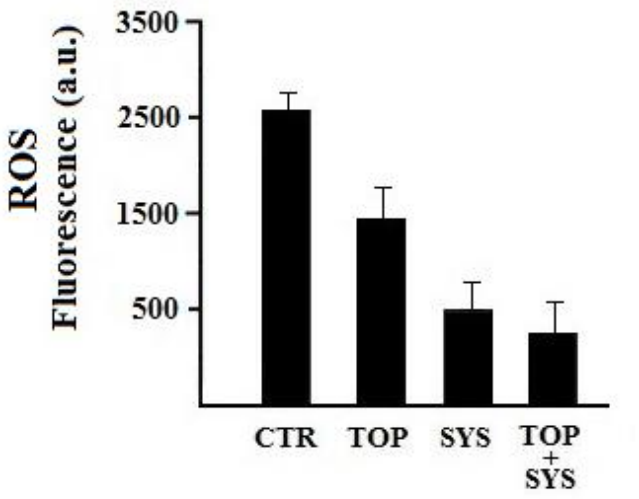


Figure 1B

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.

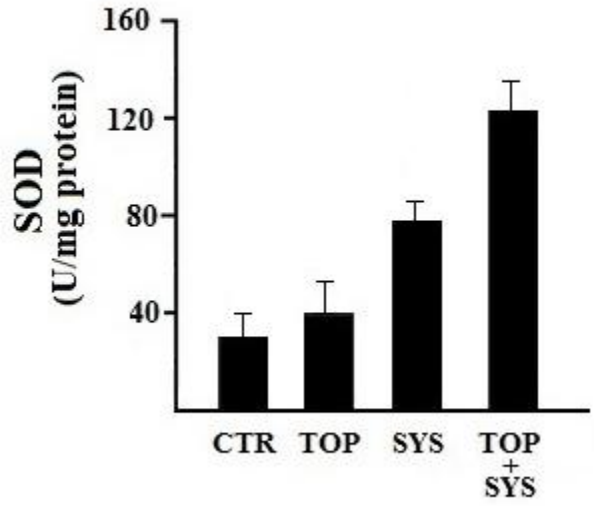


Figure 2

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 3A). 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 3A e 3B). 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 (Figure 3B).

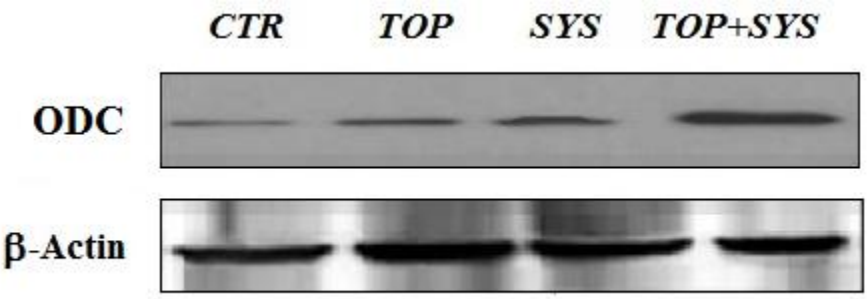


Figure 3A

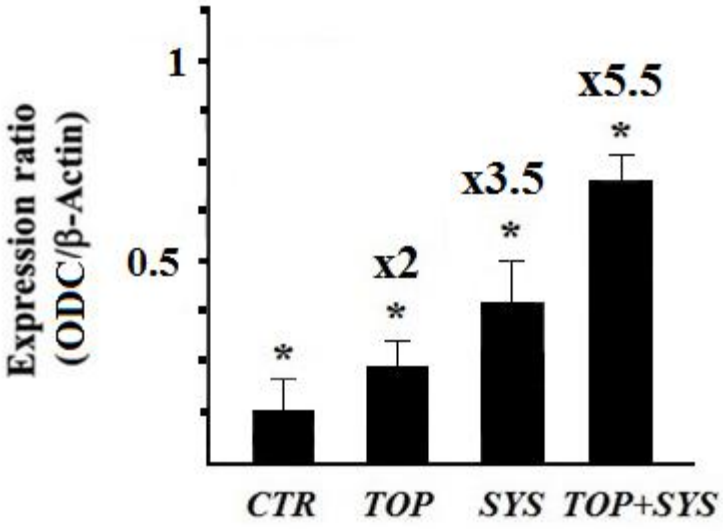


Figure 3B

Espressione e attività della proteina TG2.

Le transglutaminasi catalizzano la sintesi dei legami incrociati covalenti ϒ-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 4A e 4B). 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 4B).

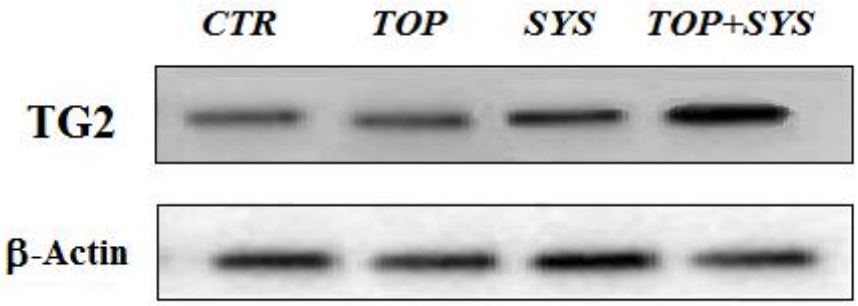


Figura 4A

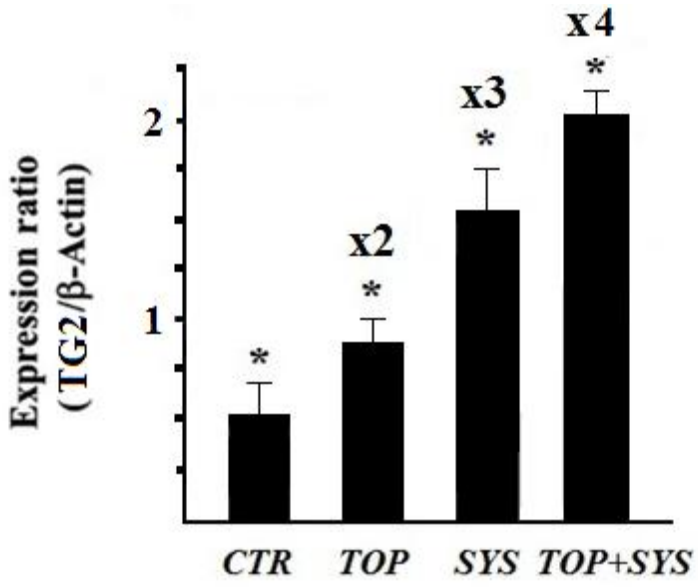


Figura 4B

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 Fig. 2A. 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 (Fig.5).

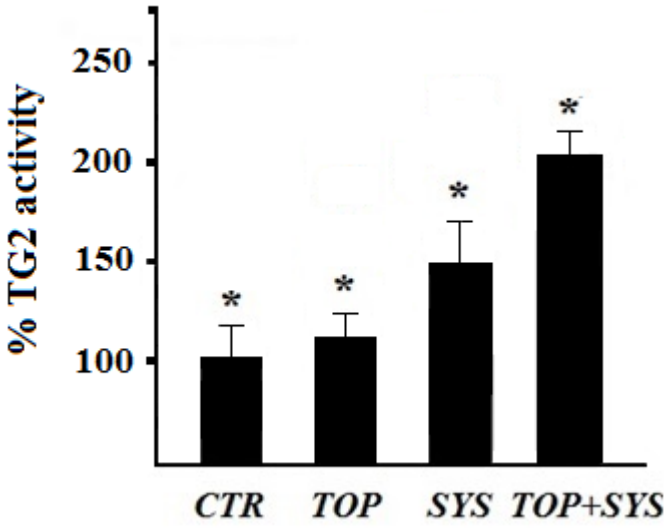


Figura 5

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).

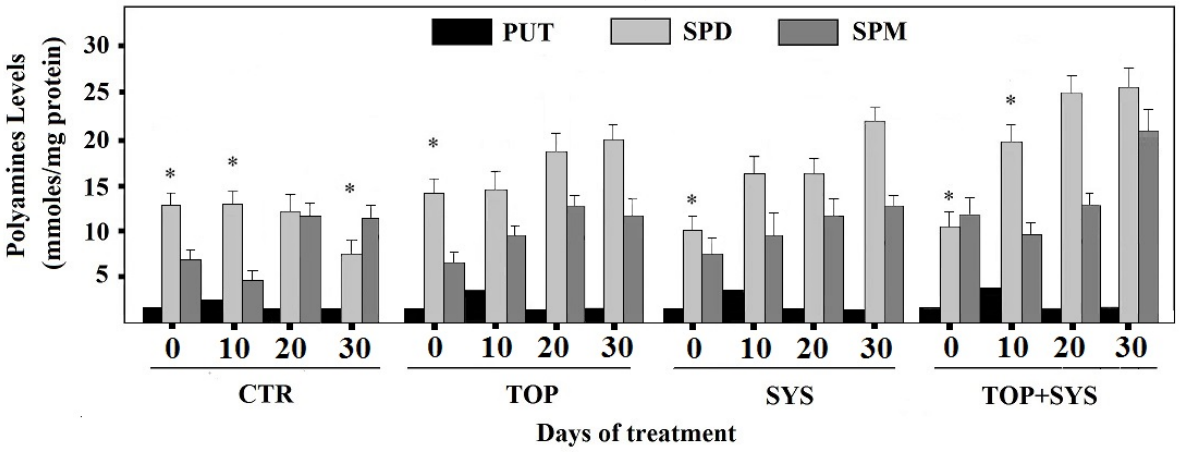


Figura 6

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**.**

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

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).

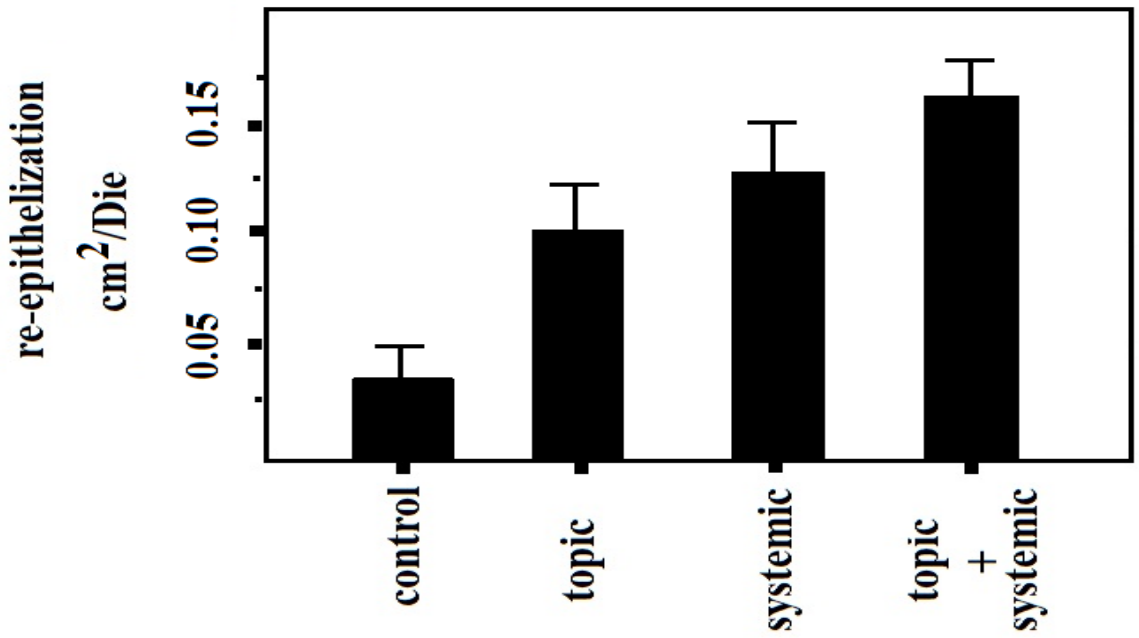


FIGURA 7

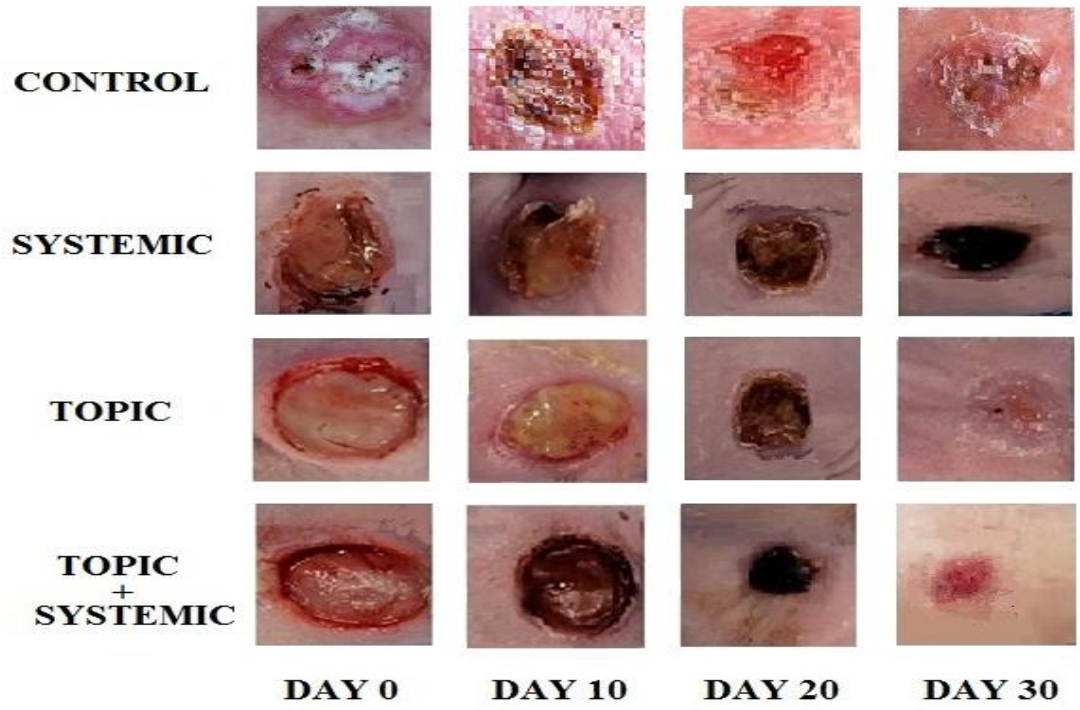


FIGURA 8

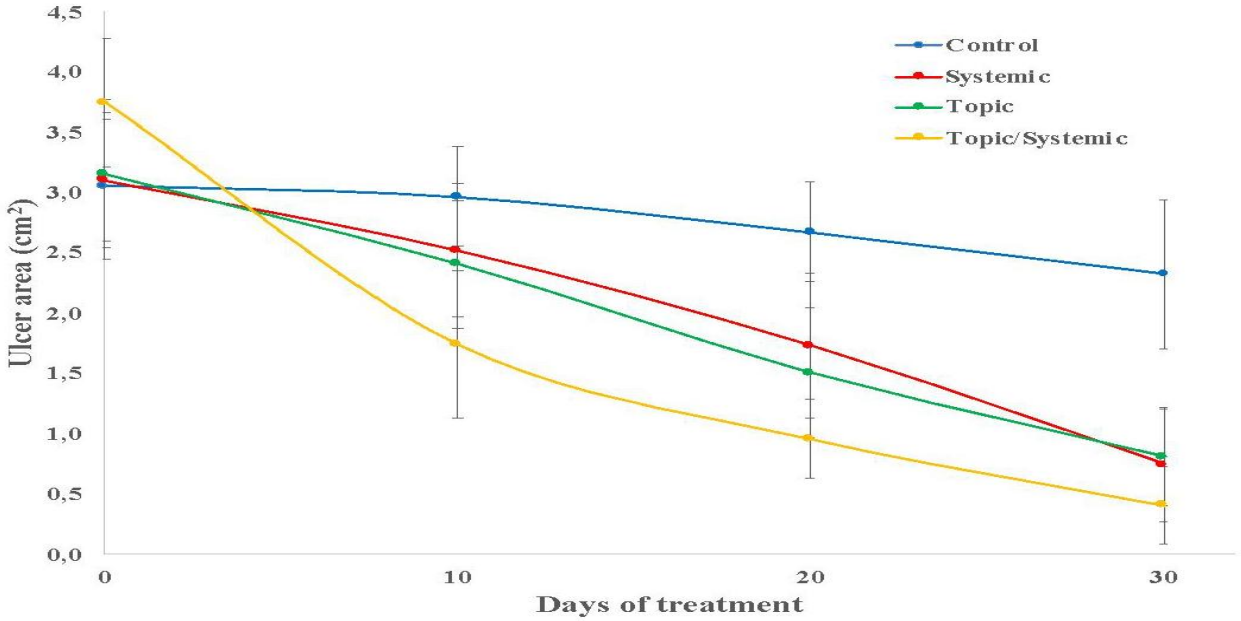


FIGURA 9 Rappresentazione grafica della chiusura della ferita dopo i vari trattamenti confrontati con il controllo non trattato

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®].

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 ϒ-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]

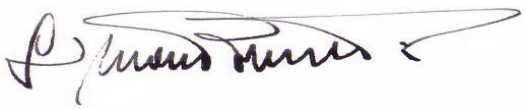
34. Qiu Y, Team V, Osadnik CR, Weller CD. Barriers and enablers to physical activity in people with venous leg ulcers: a systematic review of qualitative studies. *Int J Nurs Stud*. 2022;135:104329. [PubMed] [Google Scholar]

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 li. 03 Marzo 2024

Il responsabile del progetto



Prof. Dott. Simone Beninati

Iscrizione all'albo professionale ONB – AA083035

ORCID public record http://orcid.org/0000-0002-2704-0745