



Articolo originale

Un integratore alimentare naturale come nuovo possibile approccio terapeutico nei pazienti affetti da malattia renale cronica

Annalisa Noce ^{1,*}, Alessio Bocedi ², Margherita Campo ³, Giulia Marrone ^{1,4}, Manuela Di Lauro ¹, Giada Cattani ², Nicola Di Daniele ¹ and Annalisa Romani ^{3,*}

¹ UOC di Medicina Interna-Centro di Ipertensione e Nefrologia Unità, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università di Roma Tor Vergata, Via Montpellier 1, 00133 Roma, Italia;

² Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica 1, 00133 Roma, Italia;

³ PHYTO LAB (Farmaceutico, Cosmetico, Supplemento Alimentare, Tecnologia e Analisi)-DiSIA, Università di Firenze, Via U. Schiff, 6, 50019 Sesto Fiorentino, Italia;

⁴ Scuola di dottorato in Medicina applicata, scienze chirurgiche, Università di Roma Tor Vergata, via Montpellier 1, 00133 Roma, Italia.

Ricevuto: 22 maggio 2020; Accettato: 7 Luglio 2020; Pubblicato: 10 Luglio 2020.

Abstract: L'identificazione di composti naturali bioattivi, in grado di contrastare l'aumento dello stress ossidativo e dello stato infiammatorio nelle malattie cronic-degenerative non trasmissibili, risulta assai utile per la gestione clinica di tali condizioni. Nel presente studio, è stato testato un integratore alimentare orale (OFS), chimicamente caratterizzato, attraverso una sperimentazione *in vitro* e *in vivo*. La vitamina C, analizzata mediante HPLC-DAD, era di 0,19 mg/g in estratto secco di rosa canina e 15,74 mg/capsula nell'OFS. L'identificazione dei polifenoli è stata eseguita mediante HPLC-DAD; la capacità antiossidante totale è stata valutata dal test Folin-Ciocalteu. I polifenoli totali erano 14,73 mg/g GAE per l'estratto di rosa canina e 1,93 mg/g GAE per l'OFS. Per la sperimentazione *in vivo*, sono stati reclutati 21 pazienti affetti da malattia renale cronica (CKD) in terapia conservativa e 10 volontari sani. La valutazione dei parametri laboratoristici di routine e quelli infiammatori, dell'e-GST, dell'albumina sierica ossidata (HSAox) e la valutazione della composizione corporea sono state eseguite in due tempi successivi: al basale (T0) e dopo cinque settimane di assunzione dell'OFS (T1). Al termine dello studio è stata osservata una significativa riduzione dei biomarcatori infiammatori tradizionali (come la proteina C-reattiva, la velocità di eritrosedimentazione, il rapporto piastrine/ linfociti) e di altri parametri laboratoristici come l'e-GST, l'azotemia e l'albuminuria dopo il trattamento con l'OFS nei pazienti con CKD. Inoltre, è stato osservato un miglioramento del profilo lipidico nei pazienti con CKD dopo l'assunzione dell'OFS.

Parole chiave: biomarcatori infiammatori; composti bioattivi; antiossidanti naturali; vitamina C, terapia conservativa; glutazione transferasi eritrocitaria.

1. Introduzione

La malattia renale cronica (CKD) rappresenta un grave problema di salute con un notevole impatto a livello mondiale e la sua insorgenza è correlata alla diffusione dei suoi fattori di rischio come l'obesità, la sindrome metabolica, l'ipertensione arteriosa e il diabete mellito (DM) [1,2].

La CKD è direttamente correlata alla mortalità e alla morbilità cardiovascolare (CV). Quest'ultima mostra un aumento di circa 10-20 volte rispetto alla popolazione generale [3,4]. Tale fenomeno non può essere spiegato solo con i fattori di rischio CV tradizionali, ma ha bisogno di una valutazione più accurata che prenda in considerazione i fattori di rischio CV tipici dello stato uremico. I fattori di rischio CV che esercitano un ruolo chiave in tale condizione sono: lo stato infiammatorio cronico di basso grado [5], l'alterazione del metabolismo del calcio-fosforo [6-9], l'iperomocisteinemia [10], la malnutrizione [11], la sarcopenia uremica [12-14] e lo stress ossidativo (OS) [15,16].

L'aumento dell'OS è causato da uno squilibrio tra le difese antiossidanti e la produzione di radicali liberi. I radicali liberi dall'ossigeno vengono principalmente prodotti al livello dei mitocondri e l'aumento della loro produzione è profondamente legata all'invecchiamento, al DM, alla CKD e all'infiammazione [17]. L'aumento della concentrazione di sostanze pro-ossidanti influenza la comunicazione cellulare; nel rene promuove l'apoptosi e la senescenza cellulare, determinando una ridotta capacità cellulare rigenerativa e fibrosi [18,19].

La vitamina C è uno dei possibili fattori correlati all'insorgenza dello OS nei pazienti uremici [20,21]. Infatti, è comune osservare una carenza di vitamina C in questa popolazione di pazienti a causa di un'assunzione limitata di alimenti ricchi di vitamina C e del suo alterato metabolismo indotto dallo stato infiammatorio cronico di basso grado [22].

Al giorno d'oggi, sono numerosi gli studi mirati alla formulazione di integratori alimentari orali (OFS) ad alto contenuto di acido ascorbico proveniente da agrumi ed estratti naturali di rosa canina [23,24] piuttosto che di acido ascorbico di sintesi. Infatti, in questo contesto, sarebbe molto utile identificare composti naturali bioattivi, che sono in grado di contrastare l'aumento dello stress ossidativo e dello stato infiammatorio tipico delle malattie cronico-degenerative non trasmissibili [25,26].

Nel presente studio un OFS, arricchito in estratto naturale di rosa canina standardizzato e caratterizzato, è stato testato sia in pazienti con CKD che in soggetti sani. In particolare, l'estratto di rosa canina standardizzato è stato chimicamente caratterizzato per i suoi polifenoli e il contenuto di vitamina C.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti di Siuper®, un OFS a base di Echinacea angustifolia, zinco, rosa canina, propoli e pappa reale, al dosaggio di 400 mg al giorno (3 cps/die), sullo stato infiammatorio, sullo OS, sulla tossicità ematica, sulla composizione corporea e sulla funzione renale, sia nei pazienti CKD che nei soggetti sani. Per la valutazione dello stato infiammatorio sono state esaminate la proteina C-reattiva (PCR), la velocità di eritrosedimentazione (VES), il rapporto piastrine/linfociti (PLR), il rapporto neutrofilo/linfocito (NLR) e il rapporto linfocito/monocito (LMR) [27].

Inoltre, nel presente studio sono stati selezionati anche due biomarcatori della tossicità ematica, come la glutatione transferasi eritrocitaria (e-GST) e l'albumina sierica ossidata (HSAox) [19,28]. La e-GST è stata selezionata per la sua notevole sensibilità nel rilevamento di un grande spettro di tossine ematiche [12] in un arco temporale di poche settimane. Al contrario, la HSAox è un biomarcatore a breve termine di OS e la sua concentrazione di sangue può cambiare nell'arco temporale di poche ore [15].

2. Risultati

2.1. Caratterizzazione chimica dell'estratto secco di rosa canina e dell'integratore alimentare

I risultati sono calcolati con curve di calibrazione esterne, di solito in acido gallico, ed espressi come mg/g di equivalenti di acido gallico (GAE). L'attività antiossidante *in vitro* mostra una correlazione con i fenoli totali e i composti minori polari, come confermato da studi precedenti condotti confrontando diversi saggi di reazione di trasferimento di elettroni (ad esempio FRAP, TEAC e ORAC) e saggi *in vitro* sulle lipoproteine umane a bassa densità (LDL) [29-31]. Il contenuto totale di fenoli e polifenoli è di 14,73 mg/g GAE per l'estratto di rosa canina e 1,93 mg/g GAE per l'integratore

alimentare Siuper®. Il profilo HPLC-DAD ha permesso l'identificazione delle principali sottoclassi polifenoliche nell'estratto secco della rosa canina e nel Siuper®. Le procianidine sono i principali polifenoli presenti, ma sono stati identificati anche derivati idrossicinnamici e flavonoli (principalmente derivati quercetina e kaempferol), come tiliroside, un glicosiloxiflavone derivante da un'unità kaempferol e un acido p-cumarico. Il contenuto totale di vitamina C dall'analisi HPLC-DAD era 0,19 mg/g di polvere nell'estratto secco di rosa canina e 39,34 mg/g di polvere nel Siuper® (15,74 mg/capsula).

2.2. Effetto dell'integratore alimentare orale nei pazienti affetti da CKD e nei soggetti sani

Le caratteristiche epidemiologiche e l'analisi statistica per valutare l'omogeneità dei due gruppi di studio sono state riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Risultati epidemiologici della popolazione di studio e valutazione dell'omogeneità dei gruppi di studio.

	Pazienti affetti da CKD	Soggetti sani	P (Test ANOVA)
N	21	10	
Sesso (maschio/femmina)	13/8	6/4	ns
Età (anni)	68,7 ± 10,0 ^a	67,1 ± 4,6 ^a	ns
Altezza (m)	1,64 ± 0,10 ^a	1,67 ± 0,1 ^a	ns
Peso (kg)	73,6 ± 12,9 ^a	73,9 ± 5,5 ^a	ns
BMI (kg/m²)	27.3 ± 4,8 ^a	26,7 ± 3,0 ^a	ns

^a dati espressi come media ± deviazione standard. Abbreviazioni: BMI, indice di massa corporea; CKD, Malattia renale cronica; ns, non significativo.

Nella Tabella 2 sono riportati i parametri laboratoristici di routine dei pazienti affetti da CKD in diversi tempi dello studio (T0 e T1).

In particolare, è osservata una riduzione significativa dell'albuminuria (10 (0-100) mg/dl vs 0 (0-70) mg/dl, $p=0,0234$) e dell'azotaemia (79 ± 29 mg/dl vs 73 ± 25 mg/dl, $p=0,0024$) dopo il trattamento con l'OFS. È stata inoltre evidenziata una riduzione dei trigliceridi ematici e della transferrina (137 ± 57 mg/dl vs 115 ± 53 mg/dl, $p=0,0041$; 239 ± 42 mg/dl vs 227 ± 33 mg/dl, $p=0,0428$ rispettivamente). Non è invece stato osservato alcun effetto significativo del trattamento con OFS sui livelli di fosforo, calcio e paratormone (PTH).

Nei soggetti sani non sono state osservate differenze statisticamente significative nei parametri laboratoristici di routine, come riportato nella Tabella 3.

Tabella 2. Parametri laboratoristici di routine dei pazienti affetti da CKD.

	T0	T1	T0 vs T1
Creatinina (mg/dL)	2.0 (1.1-4.5) ^a	1.9 (1.1-4.7) ^a	ns ^b
e-GFR (mL/min/1,73 m²)	33 ± 16 ^c	33 ± 16 ^c	ns ^d
Albuminuria (mg/dL)	10 (0-100) ^a	0 (0-70) ^a	$p = 0,0234^b$
Azotemia (mg/dL)	79 ± 29 ^c	73 ± 25 ^c	$p = 0,0024^d$
Albumina (g/dL)	4,3 ± 0,2 ^c	4,2 ± 0,1 ^c	ns ^d
Emoglobina (g/dL)	12,9 ± 2,1 ^c	12,7 ± 2,3 ^c	ns ^d
Sodio (mEq/L)	140 (133-144) ^a	140 (134-143) ^a	ns ^b
Potassio (mEq/L)	4,8 ± 0,5 ^c	4,8 ± 0,4 ^c	ns ^d
Calcio (mg/dL)	9.7 (7.9-10.5) ^a	9.7 (8.3-10.5) ^a	ns ^b
Fosforo (mg/dL)	3,4 ± 0,6 ^c	3,4 ± 0,6 ^c	ns ^d
PTH (pg/ml)	141.29±76,3 ^c	137.3±81,3 ^c	ns ^d
TC (mg/dL)	174 ± 36 ^c	167 ± 33 ^c	ns ^d
HDL (mg/dL)	51 ± 13 ^c	49 ± 12 ^c	ns ^d
Trigliceridi (mg/dL)	137 ± 57 ^c	115 ± 53 ^c	$p = 0.0041^d$

LDL (mg/dL)	103 ± 45 ^c	97 ± 33 ^c	ns ^d
Sideremia (µg/dL)	70 ± 24 ^c	70 ± 31 ^c	ns ^d
Ferritina (ng/mL)	85 (7-561) ^a	95 (7-541) ^a	<i>p</i> = 0,0289 ^b
Transferrina (mg/dL)	239 ± 42 ^c	227 ± 33 ^c	<i>p</i> = 0.0428 ^d
Acido urico (mg/dL)	6.7 (2.4-9.0) ^a	6.7 (1.8-9.6) ^a	ns ^b

^a dati espressi come mediana (minimo-massimo); ^b Test applicato: test Wilcoxon; ^c Dati espressi come media ± deviazione standard; ^d Test applicato: test *t* per i dati accoppiati. I valori di *p* ≤ 0,05 sono considerati statisticamente significativi. Abbreviazioni: e-GFR, tasso di filtrazione glomerare stimato; TC, colesterolo totale; HDL, lipoproteina ad alta densità; LDL, lipoproteina a bassa densità; ns, non significativo, PTH, paratormone.

Tabella 3. Parametri laboratoristici di routine di soggetti sani.

	T0	T1	T0 vs T1
Creatinina (mg/dL)	0,79 ± 0,14 ^a	0,8 ± 0,14 ^a	ns ^b
e-GFR (mL/min/1,73 m ²)	93,5 ± 20,4 ^a	92,1 ± 14,3 ^a	ns ^b
Albuminuria (mg/dL)	2.1 ± 4,4 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	ns ^b
Azotemia (mg/dL)	32,6 ± 8,0 ^a	34,8 ± 4,7 ^a	ns ^b
Albumina (g/dL)	4,3 ± 0,2 ^a	4,4 ± 0,3 ^a	ns ^b
Emoglobina (g/dL)	14,3 ± 1,5 ^a	14,3 ± 1,6 ^a	ns ^b
Sodio (mEq/L)	141.7 ± 2.6 ^a	140 ± 2,9 ^a	ns ^b
Potassio (mEq/L)	4,5 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,3 ^a	ns ^b
Calcio (mg/dL)	9,3 ± 0,4 ^a	9,7 ± 0,4 ^a	ns ^b
Fosforo (mg/dL)	3,5 ± 0,5 ^a	3,6 ± 0,5 ^a	ns ^b
PTH (pg/ml)	56.2 ± 10,3 ^a	59,5 ± 7,1 ^a	ns ^b
TC (mg/dL)	196,3 ± 26,5 ^a	188,9 ± 19,8 ^a	ns ^b
HDL (mg/dL)	50,3 ± 12,5 ^a	52,9 ± 11,9 ^a	ns ^b
Trigliceridi (mg/dL)	99,5 ± 32,6 ^a	92,4 ± 34,0 ^a	ns ^b
LDL (mg/dL)	116.4 ± 21,4 ^a	120.7 ± 18,2 ^a	ns ^b
Sideremia (µg/dL)	89.5 ± 25.1 ^a	85,7 ± 20,7 ^a	ns ^b
Ferritina (ng/mL)	195,2 ± 163,9 ^a	179,4 ± 139,7 ^a	ns ^b
Transferrina (mg/dL)	255,7 ± 39,6 ^a	248,5 ± 34,7 ^a	ns ^b
Acido urico (mg/dL)	5,0 ± 1,0 ^a	4,9 ± 0,9 ^a	ns ^b

^a dati espressi come media ± deviazione standard; ^b Test applicato: *t*-test per i dati accoppiati. I valori di *p* ≤ 0,05 sono considerati statisticamente significativi. Abbreviazioni: e-GFR, tasso di filtrazione glomerare stimato; TC, colesterolo totale; HDL, lipoproteina ad alta densità; LDL, lipoproteina a bassa densità; ns, non significativo, PTH, paratormone.

Nella Tabella 4, sono illustrati i parametri di composizione corporea del gruppo dei pazienti affetti da CKD prima e dopo il trattamento OFS; tutti i parametri esaminati non hanno subito cambiamenti statisticamente significativi.

Tabella 4. Parametri di composizione corporea dei pazienti affetti da CKD.

	T0	T1	T0 vs T1
Resistenza (ohm)	503 ± 95 ^a	503 ± 85 ^a	ns ^b
Reazione (ohm)	37 ± 6 ^a	38 ± 8 ^a	ns ^b
Angolo di fase	4.2 ± 0,8 ^a	4,4 ± 1,0 ^a	ns ^b
BMI (Kg/m ²)	27.2 ± 5.1 ^a	27.1 ± 5.2 ^a	ns ^b
Peso (Kg)	73,2 ± 13,3 ^a	73,3 ± 12,7 ^a	ns ^b
TBW (%)	55,7 ± 7,3 ^a	55,5 ± 6,8 ^a	ns ^b
ICW (%)	43,6 ± 5,7 ^a	44,1 ± 7,1 ^a	ns ^b
ECW (%)	54,5 ± 10,1 ^a	55,5 ± 6,9 ^a	ns ^b
FM (%)	30,2 ± 9,4 ^a	30,5 ± 8,9 ^a	ns ^b
FFM (%)	70.2 (46.6-88.1) ^c	69,8 (48,1-86,7) ^c	ns ^d

MM (%)	38,6 ± 8,1 ^a	38,9 ± 7,8 ^a	ns ^b
BCMI (Kg/m²)	7,9 ± 1,9 ^a	8.1 ± 2,0 ^a	ns ^b

^a dati espressi come media ± deviazione standard; ^b Test applicato: t-test per i dati accoppiati; ^c dati espressi come mediana (minimo-massimo); ^d Test applicato: test Wilcoxon. I valori di $p \leq 0,05$ sono considerati statisticamente significativi. Abbreviazioni: *BMI*, indice di massa corporea; *TBW*, acqua totale corporea; *ICW*, acqua intra-cellulare; *ECW*, acqua extra-cellulare; *FM*, massa grassa; *FFM*, massa magra; *MM*, massa muscolare; *BCMI*, indice di massa cellulare corporea; *ns*, non significativo.

La pressione sanguigna non ha mostrato cambiamenti dopo il trattamento, sia nei pazienti affetti da CKD che nei soggetti sani (Tabella 5 e Tabella 6).

Tabella 5. Pressione sanguigna dei pazienti affetti da CKD.

	T0	T1	T0 vs T1
Pressione sistolica (mmHg)	135 ± 17 ^a	135 ± 14 ^a	ns ^b
Pressione diastolica (mmHg)	77 ± 12 ^a	75 ± 10 ^a	ns ^b

^aDati espressi come media ± deviazione standard; ^b Test applicato: test t per i dati accoppiati. I valori di $p \leq 0,05$ sono considerati statisticamente significativi. Abbreviazioni: *ns*, non significativo.

Tabella 6. Pressione sanguigna dei soggetti sani.

	T0	T1	T0 vs T1
Pressione sistolica (mmHg)	117.5±11,3 ^a	113.6±9,8 ^a	ns ^b
Pressione diastolica (mmHg)	73,8 ± 6,6 ^a	75.1±12.0 ^a	ns ^b

^adati espressi come media ± deviazione standard; ^b Test applicato: t-test per i dati accoppiati. I valori di $p \leq 0,05$ sono considerati statisticamente significativi. Abbreviazioni: *ns*, non significativo.

È interessante notare che nei pazienti affetti da CKD è stata osservata una significativa riduzione dei biomarcatori infiammatori esaminati; infatti, la PCR e la VES sono diminuiti in modo significativo a T1 (dopo 5 settimane di trattamento con OFS), come riportato nella Tabella 7.

Inoltre, al T1 (Tabella 7) è stata osservata una significativa riduzione dell'attività della e-GST.

Infine, l'HSAox non ha mostrato alcuna variazione significativa durante quattro saggi distinti dalle settimane da 1 a 5 del trattamento con l'OFS (Figura 1 e Tabella 7).

I biomarcatori di stress infiammatorio e ossidativo dei soggetti sani sono riportati nella Tabella 8. Non è stato osservato alcun cambiamento statisticamente significativo dopo il trattamento con l'OFS.

Tabella 7. Biomarcatori di stress infiammatori e ossidativi dei pazienti affetti da CKD.

	T0	T1	T0 vs T1
PCR (mg/L)	2.6 (0.2-48.1) ^a	2.3 (0.4-34.6) ^a	$p = 0,0121^b$
VES (mm/h)	40 ± 27 ^c	34 ± 19 ^c	$p = 0.0446^d$
e-GST (U/g Hb)	10.0 (6.1-23.5) ^a	9.1 (4.8-25.8) ^a	$p = 0,0296^b$
HSAox (%)	41 ± 10 ^c	43 ± 8 ^c	ns ^d

^adati espressi come mediana (minimo-massimo); ^bTest applicato: Wilcoxon test; ^cDati espressi come media ± deviazione standard; ^dTest applicato: test t per i dati accoppiati. I valori di $p \leq 0,05$ sono considerati statisticamente significativi. Abbreviazioni: *PCR*, proteina C-reattiva; *VES*, velocità di eritrosedimentazione; *e-GST*, glutatione transferasi eritrocitaria; *HSAox*, albumina sierica ossidato; *ns*, non significativo.

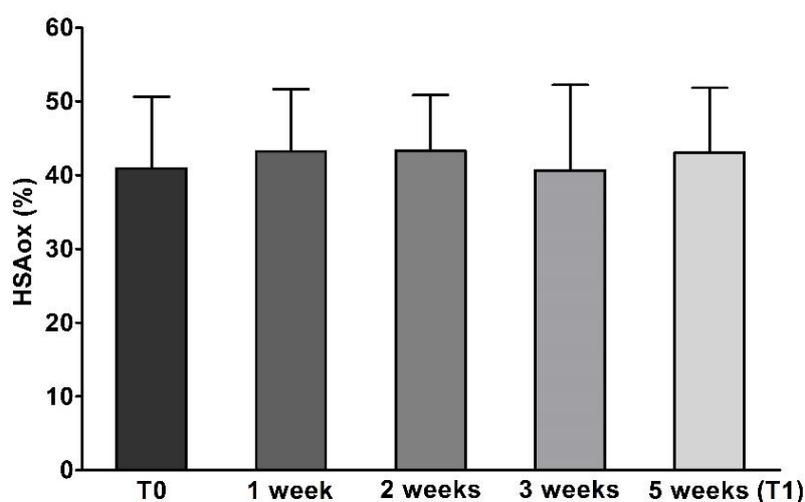


Figura 1. Albumina sierica ossidata nei pazienti affetti da malattia renale cronica. Le barre (cinque sfumature di grigio) rappresentano i valori di HSAox determinati in vari tempi dello studio (T0-baseline, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane e 5 settimane- T1) per i pazienti affetti da CKD (N = 21). I valori vengono riportati come media \pm deviazione standard.

Tabella 8. Biomarcatori di stress infiammatorio e ossidativo dei soggetti sani.

	T0	T1	T0 vs T1
PCR (mg/L)	2,8 \pm 2,9 ^a	1,8 \pm 1,8 ^a	ns ^b
VES (mm/h)	8,5 \pm 2,1 ^a	5,0 \pm 4,2 ^a	ns ^b
e-GST (U/g Hb)	7,6 \pm 2,6 ^a	7,3 \pm 2,7 ^a	ns ^b
HSAox (%)	30,7 \pm 5,5 ^a	29,7 \pm 3,2 ^a	ns ^b

^adati espressi come media \pm deviazione standard; ^bTest applicato: t-test per i dati accoppiati. I valori di $p \leq 0,05$ sono considerati statisticamente significativi. Abbreviazioni: PCR, proteina C-reattiva; VES, velocità di eritrosedimentazione e-GST, glutatione transferasi eritrocitaria; HSAox, albumina sierica ossidata; ns, non significativo.

Nei soggetti sani, cambiamenti significativi sono stati osservati solo nella composizione corporea. In particolare, un aumento dell'angolo di fase, della FFM (%), della MM (%) e della TBW (%) dopo il trattamento con l'OFS (Tabella 9). In particolare, una significativa riduzione dell'FM (%) è stato osservato in soggetti sani.

Tabella 9. Parametri di composizione corporea dei soggetti sani.

	T0	T1	T0 vs T1
Resistenza (ohm)	546 \pm 44 ^a	543 \pm 45 ^a	ns ^b
Reazione (ohm)	53 \pm 12 ^a	53 \pm 11 ^a	ns ^b
Angolo di fase	5.0 (4.5-7) ^c	5.2 (4.7-6.9) ^c	$p - 0,0195^d$
BMI (Kg/m ²)	27,4 (22,5-27,6) ^c	27,0 (22,4-27,8) ^c	ns ^d
Peso (Kg)	73,8 (70,1-92,5) ^c	73,5 (69,0-92,3) ^c	ns ^d
TBW (%)	52,4 \pm 4,1 ^a	53,1 \pm 3,9 ^a	$p - 0,0029^d$
ICW (%)	49,3 (46,5-58,5) ^c	50,3 (46,9-58,0) ^c	ns ^d
ECW (%)	50,7 (41,5-53,5) ^c	49,7 (42,0-54,1) ^c	ns ^d
FM (%)	28,4 \pm 5,7 ^a	27,7 \pm 5,2 ^a	$p - 0,0049^b$

FFM (%)	71,5 ± 5,7 ^a	72,4 ± 5,1 ^a	<i>p</i> - 0,0055 ^b
MM (%)	45,0 ± 4,7 ^a	45,7 ± 4,0 ^a	<i>p</i> - 0,0226 ^b
BCMI (Kg/m²)	9,2 ± 0,9 ^a	9,4 ± 0,8 ^a	<i>p</i> - 0,0163 ^b

^adati espressi come media ± deviazione standard; ^bTest applicato: t-test per i dati accoppiati; ^cI dati espressi come mediana (minimo-massimo); ^dTest applicato: test Wilcoxon. I valori di *p* ≤ 0,05 sono considerati statisticamente significativi. Abbreviazioni: BMI, indice di massa corporea; TBW, acqua totale corporea; ICW, acqua intra-cellulare; ECW, acqua extra-cellulare; FM, massa grassa; FFM, massa magra; MM, massa muscolare; BCMI, indice di massa cellulare corporea; ns, non significativo.

È stato inoltre valutato l'impatto dell'OFS sul sistema immunitario e sullo stato infiammatorio (Tabella 10 e 11). Nei pazienti affetti da CKD è stata osservata una riduzione significativa di PLR (146,2 (86,2-398,7) vs 122,0 (54,7-337,5), *p*=0,004) (Tabella 10).

Nei soggetti sani, non sono state osservate differenze statisticamente significative negli altri marcatori biologici esaminati (Tabella 11).

Tabella 10. Altri marcatori biologici dei pazienti affetti da CKD

	T0	T1	T0 vs T1
Rapporto piastrine/linfociti	146.2 (86.2-398.7) ^a	122.0 (54.7-337.5) ^a	<i>p</i> =0,004 ^b
Rapporto neutrofilo/linfocite	1.9 (0.52-6.6) ^a	1.3 (0.9-8.9) ^a	ns ^b
Rapporto linfociti/monociti	3.7 (1.6-10.2) ^a	3.8 (1.6-8.1) ^a	ns ^b
Linfociti (n/mm³)	1,9 ± 0,7 ^c	1,8 ± 0,6 ^c	ns ^d

^adati espressi come mediana (minimo-massimo); ^bTest applicato: Wilcoxon test; ^cDati espressi come media ± deviazione standard; ^dTest applicato: test t per i dati accoppiati. I valori di *p* ≤ 0,05 sono considerati statisticamente significativi. Abbreviazioni: ns, non significativo.

Tabella 11. Altri marcatori biologici dei soggetti sani.

	T0	T1	T0 vs T1
Rapporto piastrine/linfociti	121,0 ± 27,4 ^c	109.9±27,7 ^c	ns ^d
Rapporto neutrofilo/linfocite	1.4 (0,5-3,2) ^a	1,5 ± 0,4 ^c	ns ^b
Rapporto linfociti/monociti	4,6 ± 1,4 ^c	5,1 ± 1,4 ^c	ns ^d
Linfociti (n/mm³)	2,3 ± 0,5 ^c	2,4 ± 0,5 ^c	ns ^d

^adati espressi come mediana (minimo-massimo); ^bTest applicato: Wilcoxon test; ^cDati espressi come media ± deviazione standard; ^dTest applicato: test t per i dati accoppiati. I valori di *p* ≤ 0,05 sono considerati statisticamente significativi. Abbreviazioni: ns, non significativo.

In precedenti studi è stata descritta una correlazione inversa tra la concentrazione di vitamina D e lo stato infiammatorio (valutato mediante PLR e NLR) [32], per questo è stato ritenuto opportuno includere nei criteri di esclusione una concentrazione sierica di vitamina D <30 ng/ml. Inoltre, è stata raccolta un'anamnesi farmacologica per quanto riguarda l'approccio terapeutico per la gestione del metabolismo del calcio-fosforo (Figura 2).

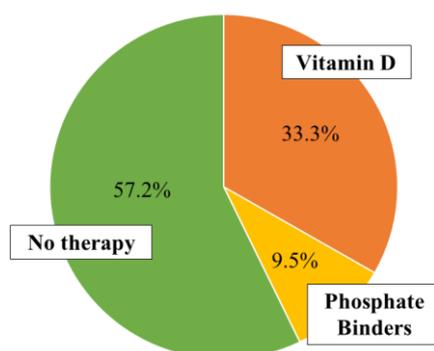


Figura 2. Terapia farmacologica sul metabolismo del calcio-fosforo.

Per confermare che i miglioramenti osservati nello stato di salute delle popolazioni studiate erano dovuti all'assunzione di OFS e non ai cambiamenti di stile di vita (come le abitudini alimentari e l'attività fisica), sono stati somministrati nei due tempi dello studio (T0 e T1) a tutti i soggetti arruolati due questionari: PREDIMED e IPAQ. Questi questionari non hanno mostrato, tra i due tempi di osservazione, cambiamenti statisticamente significativi, confermando gli effetti putativi sulla salute indotti dal trattamento con l'OFS (Tabella 12 e Tabella 13).

Tabella 12. Questionario PREDIMED

	Pazienti affetti da CKD			Soggetti sani		
	T0	T1	P (Test di McNemar)	T0	T1	P (Test di McNemar)
Aderenza minima (%)	0	0	ns	0	0	ns
Aderenza media (%)	86	81	ns	80	80	ns
Aderenza massima (%)	14	19	ns	20	20	ns

Abbreviazione: *ns*, non significativa.

Tabella 13. Questionario IPAQ

	Pazienti affetti da CKD			Soggetti sani		
	T0	T1	P (Test di McNemar)	T0	T1	P (Test di McNemar)
Inattivo (%)	48	52	ns	60	60	ns
Sufficientemente attivo (%)	48	44	ns	40	40	ns
Molto attivo (%)	4	4	ns	0	0	ns

Abbreviazione: *ns*, non significativa.

3. Discussione

I pazienti affetti da CKD sono caratterizzati da uno stato infiammatorio cronico di basso grado, un aumentato livello di stress ossidativo e una alterata risposta immunitaria [33]. Questi fattori sono interconnessi con un aumento del rischio di insorgenza delle malattie CV. Per tale motivo, risulta utile l'identificazione di un OFS naturale, non prodotto sinteticamente, standardizzato nel contenuto di polifenoli e vitamina C, che potrebbe contrastare l'infiammazione, lo stress ossidativo e, allo stesso tempo, modulare la risposta immunitaria. L'OFS sarebbe un valido strumento per migliorare la qualità della vita e ridurre la comorbidità CV nei pazienti nefropatici in terapia conservativa.

Nel presente studio, è stato evidenziato che l'assunzione di OFS Siuper® per cinque settimane diminuisce significativamente i biomarcatori infiammatori tradizionali come la PCR, la VES e un

nuovo biomarcatore infiammatorio come il PLR. Quest'ultimo è stato correlato allo stato proinfiammatorio e protrombotico [34]. Inoltre, studi precedenti hanno dimostrato che alti livelli di PCR, la proteina di risposta della fase acuta, sono correlati ad un più alto tasso di ospedalizzazione e a livelli più bassi di albumina sierica nei pazienti in pre-dialisi [35]. Valori elevati di PCR sono correlati ad un aumento dello spessore medio-intimale carotideo nei pazienti in pre-dialisi, evidenziando una correlazione diretta tra la concentrazione di PCR e le LDL ossidate [36]. Pertanto, appare evidente una possibile relazione tra l'aumento dello stress ossidativo e l'infiammazione, nei pazienti uremici. Tuttavia, in questo studio non è stata osservata una riduzione significativa in termini di stress ossidativo monitorata mediante HSAox. Questo risultato potrebbe essere interpretato con un tempo limitato di somministrazione dell'OFS o con la necessità di aumentare il contenuto di polifenoli e vitamina C per ogni dose di OFS.

I principali costituenti con potenziale impatto terapeutico dell'OFS sono: rosa canina, zinco ed *Echinacea angustifolia*.

In particolare, precedenti studi hanno mostrato che i livelli di zinco sono inversamente correlati alla concentrazione di citochine pro-infiammatorie, come IL-6, IL-8 e il fattore- α di necrosi tumorale (TNF- α) [37,38], regolando la loro espressione genica [39]. Nell'OFS selezionato la dose di zinco per ogni capsula è di 4,5 mg; pertanto, la dose giornaliera di zinco somministrata era di 13,5 mg, a seguito dell'assunzione giornaliera massima tollerabile (25 mg/giorno), come suggerito dai LARN italiani [40]. Pertanto, la riduzione dei biomarcatori infiammatori, osservata dopo 5 settimane di trattamento con l'OFS, può essere in parte attribuibile all'azione antinfiammatoria dello zinco.

Inoltre, anche *Echinacea angustifolia* ha mostrato proprietà antinfiammatorie come riportato in uno studio su modelli animali condotto da Aarland et al. [41]. Confermando così i dati precedenti che mostrano una riduzione dell'infiltrazione delle cellule infiammatorie, in uno studio *in vitro* [42].

Infine, la rosa canina, ricca di vitamina C e composti polifenolici, sembrerebbe esercitare un effetto antiossidante e antinfiammatorio [43]. Uno studio interessante ha dimostrato la sua azione antinfiammatoria sulla chemiotassi polimorfonucleare, evidenziando che questo effetto è esercitato in maniera "dose dipendente" [44]. Un ulteriore effetto mostrato da un estratto acquoso di rosa canina è stata l'inibizione, *in vitro*, di COX-1 e COX-2 [45].

In questo studio, una riduzione significativa dell'attività della e-GST, dopo cinque settimane di assunzione dell'OFS, è stata osservata nei pazienti con CKD. L'attività di questo enzima può essere correlata alla presenza di tossine uremiche, come precedentemente dimostrato nei pazienti uremici [46,47]. Nel presente studio, la riduzione dell'e-GST dopo il trattamento con l'OFS selezionato nei pazienti affetti da CKD (Tabella 5) e la mancanza di variazione di HSAox (Figura 1 e Tabella 5), indicano che Siuper® ha principalmente un'azione disintossicante. Infatti, parametri aggiuntivi confermano il beneficio di tale OFS nei pazienti affetti da CKD attraverso la significativa riduzione dell'azotemia e dell'albuminuria al T1. La riduzione dell'azotemia può essere vista come un'espressione di un miglioramento dello stato di tossicità ematica, confermando la possibile azione disintossicante dell'OFS; mentre l'albuminuria è un indicatore utile della progressione della CKD ed è direttamente correlato al rischio CV [48].

Questa azione disintossicante dell'OFS sembrerebbe essere causata dal suo contenuto in polifenoli e in vitamina C, in quanto entrambi sono in grado di ridurre la formazione di specie reattive di ossigeno (ROS), svolgendo un ruolo chiave nella disintossicazione cellulare [30,49]. Inoltre, uno studio condotto su giovani adulti sani ha mostrato che una bassa concentrazione sierica di acido ascorbico è correlata alla concentrazione di glutazione, tioli e alla capacità antiossidante totale [50].

È stato anche osservato un miglioramento del profilo lipidico con una riduzione statisticamente significativa dei valori di trigliceridi nel sangue alla fine del trattamento con l'OFS (Tabella 2). Questo risultato conferma la possibile attività benefica dell'OFS nella riduzione del rischio di CV [51]. Alti livelli ematici di trigliceridi predispongono ad un rischio maggiore di eventi CV, soprattutto se associati ad altri fattori di rischio come alto colesterolo LDL, obesità e DM [52,53].

Questo effetto dell'OFS potrebbe essere indotto dalla presenza di rosa canina, come evidenziato da studi precedenti. Infatti, la somministrazione di estratti di rosa canina (200 mg/kg/giorno) in modelli murini ha causato, dopo 14 giorni, una riduzione dei trigliceridi plasmatici e dei livelli di acidi grassi

liberi. Questa azione sembrerebbe essere esercitata dalla sua frazione polifenolica, in particolare dalla presenza del trans-tiliroside, che sembrerebbe promuovere il metabolismo lipidico [54].

Un altro studio conferma l'azione di riduzione dei lipidi ematici esercitata dalla rosa canina, infatti nei ratti la concentrazione di colesterolo e trigliceridi era significativa più bassa dopo una dieta ricca di rosa canina rispetto ai ratti non trattati [55].

Sono stati inoltre mostrati una riduzione statisticamente significativa della transferrina e un aumento della ferritina, pur rimanendo entro l'intervallo di normalità (Tabella 2). La loro sintesi è autoregolata in relazione allo stato marziale, ma la loro concentrazione può essere influenzata da altri fattori non correlati ai livelli sierici di ferro, come lo stato di flogosi, le epatopatie [56], la malnutrizione e la sindrome nefrotica [57].

Per quanto riguarda i possibili effetti dell'OFS selezionato sulla composizione corporea nei pazienti affetti da CKD, non sono stati osservati cambiamenti statisticamente significativi. Al contrario, in soggetti sani è stato osservato un miglioramento nella composizione corporea. In particolare, una riduzione della FM e un aumento dell'angolo di fase, TBW, FFM, MM e BCMI. Pertanto, possiamo ipotizzare che l'OFS possa agire a livello metabolico stimolando il metabolismo energetico [12].

Nei pazienti con CKD, tale miglioramento non è osservato presumibilmente poiché questa condizione induce, soprattutto nelle fasi terminali, uno stato di acidosi metabolica, che è responsabile di stimolare la via ubiquitina-proteasoma, che può indurre la proteolisi muscolare [58,59]. Pertanto, al fine di valutare il possibile effetto benefico di OFS sulla composizione corporea, sarà necessario condurre uno studio clinico randomizzato in cui verrà valutata anche l'acidosi metabolica. Inoltre, la composizione corporea sarà determinata non solo attraverso la BIA, ma anche attraverso ulteriori metodi diagnostici, come l'assorbimetria a raggi X a doppia energia.

Per dimostrare la correlazione tra la diminuzione dello stress ossidativo e la somministrazione di composti bioattivi naturali (come polifenoli e vitamina C) in presenza di CKD, sono in corso ulteriori studi tra cui la valutazione dello stress ossidativo plasmatico, dei radicali liberi totali e della capacità antiossidante totale del plasma, oltre ai parametri descritti in questo studio.

In conclusione, l'OFS selezionato sembrerebbe utile nel trattamento dello stato infiammatorio cronico e della tossicità del sangue nei pazienti affetti da CKD. I risultati promettenti ottenuti nel presente studio pilota hanno gettato le basi per un'ulteriore sperimentazione clinica randomizzata, condotta su un maggior numero di pazienti che sarà necessaria per confermare questi risultati.

4. Materiali e metodi

4.1. Integratore alimentare orale, analisi della vitamina C, contenuto totale di polifenoli e capacità antiossidante in vitro

L'OFS era il Siuper® Marispharma, Frosinone, Italia, a base di *Echinacea angustifolia*, zinco, rosa canina, propoli e pappa reale. Nel presente studio pilota L'OFS è stato somministrato alla dose di 400 mg (3 cps/ die), per la valutazione dei suoi possibili effetti sullo stato infiammatorio, OS, tossicità ematica, composizione corporea e funzione renale nei pazienti CKD e nei soggetti sani. L'estratto secco di rosa canina utilizzato come ingrediente è stato fornito dall'azienda farmaceutica Marispharma.

Per l'estrazione della vitamina C, 400 mg di polvere dell'OFS o estratto secco di rosa canina sono stati mescolati in 4,0 mL 70:30 EtOH:H₂O (pH 2.4 per aggiunta di HCOOH) a temperatura ambiente per 30 min, centrifugato a 14.000 giri/min per 5 min e analizzati. Per l'estrazione di polifenoli, 500 mg di polvere dell'OFS o estratto secco di rosa canina sono stati mescolati in 25,0 mL di 70:30 EtOH:H₂O (pH 3.2 per aggiunta di HCOOH) per 24 ore, centrifugato a 14.000 giri/min per 5 min e analizzati.

Le analisi HPLC/DAD sono state eseguite con una cromatografia liquida HP-1100 dotata di un rilevatore DAD (Agilent-Technologies, Palo Alto, USA) e di una colonna SB-aq C18 (150 × 4,6 mm i.d. 5 m) (Phenomenex Agilent-Technologies, Palo Alto, USA). Per l'acido ascorbico è stato applicato un flusso di 0,4 mL/min per 8 min con una fase mobile 95% H₂O (pH 3.2 per aggiunta di HCOOH) (A) 5% CH₃CN (B). Per l'analisi dei polifenoli, è stato applicato un gradiente lineare multifassaggio da 100% A a 100% B in 43 min con un flusso di 0,4 mL/min.

L'analisi qualitativa è stata eseguita secondo i dati cromatografici e spettrofotometrici, rispetto agli standard specifici disponibili. La quantificazione della vitamina C è stata eseguita utilizzando una curva di taratura a 5 punti ($r^2 \geq 0,999$) in acido ascorbico a 260 nm.

I fenoli totali e i polifenoli sono stati valutati mediante analisi spettrofotometrica Folin-Ciocalteu, misurando l'assorbimento a 725nm di una soluzione campione contenente reagente Folin-Ciocalteu, 20% Na_2CO_3 dopo l'incubazione di 40 minuti. La curva di taratura è stata ottenuta utilizzando cinque soluzioni di acido gallico a diverse concentrazioni. Il contenuto di fenoli di ogni campione è espresso come GAE e correlato all'attività *antiossidante in vitro* [30,31].

Tutte le analisi sono state effettuate in triplice analisi; i risultati sono dati come media e l'errore standard è stato <3%.

4.2. Prodotti chimici e reagenti

Cistamina, 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), acido etilenediaminetetraacetico (EDTA), 5,5-ditiobis(2-acido nitrobenzoico) (DTNB) (reagente di Ellman), glutathione (GSH), acido formice (HCOOH) HPLC, acetonitrile (CH_3CN) GRADO HPLC, etanolo (EtOH) grado HPLC, acido ascorbico, Folin-Ciocalteu reattivo, carbonato di sodio (Na_2CO_3) e tutti gli alitreagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.3. Pazienti

Uomini e donne di età compresa tra 18 e 80 anni sono stati considerati idonei per lo studio. Il protocollo di studio ha rispettato la dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico di Fondazione Policlinico Tor Vergata (PTV) di Roma.

Prima di iniziare allo studio, un consenso scritto pienamente informato è stato fornito a tutti i pazienti CKD e ai soggetti sani. I criteri di esclusione erano: cancro, epatite B e C, disturbi reumatologici (ad esempio, lupus eritematoso sistemico), gravidanza, emodialisi, indice di massa corporea (BMI) <18,5 Kg/m^2 , concentrazione di vitamina D <30 ng/ml e l'assunzione di integratori orali negli ultimi tre mesi.

Un totale di 21 pazienti (età media $68,7 \pm 10$ anni), affetti da CKD (stadio I-IV secondo le linee guida della National Kidney Foundation Kidney-Disease Outcomes Quality Initiative [60]), sono stati reclutati dal Centro di Ipertensione e Nefrologia unità di Fondazione PTV, Roma.

Nei pazienti affetti da CKD, le cause principali dell'insufficienza renale sono state: glomerulonephritis (10%), nefroangiosclerosi (48%), nefropatia diabetica (14%), pielonefrite cronica (5%) malattia policistica renale dominante autosomale (9%) e altre cause (14%).

All'inizio dello studio è stata eseguita una anamnesi medica completa per raccogliere informazioni sullo stato di salute, sui farmaci assunti, sulle abitudini alimentari, sul consumo di alcol, sull'abitudine tabagica e sulla storia familiare per le malattie croniche.

Dieci volontari sani matchati per i parametri di età, sesso e composizione corporea come peso, altezza e BMI, costituivano il gruppo di controllo.

Tutti i soggetti arruolati (pazienti con CKD e soggetti sani) sono stati trattati per cinque settimane con l'OFS (3 cps/die).

Una valutazione completa dei parametri laboratoristici e della composizione corporea è stata condotta in due diversi tempi dello studio, al basale (T0) e dopo cinque settimane di trattamento con l'OFS (T1). Solo l'HSAox è stato monitorata ogni settimana.

4.4. Misure antropometriche e valutazione della composizione corporea

I parametri antropometrici di tutti i partecipanti sono stati registrati secondo i metodi standard [61]. Il peso corporeo (kg) è stato misurato al più vicino 0,01 kg, utilizzando una bilancia (Seca 711, Amburgo, Germania). L'altezza (m) è stata misurata utilizzando uno stadiometro al più vicino 0,1 cm (Seca 220, Amburgo, Germania). Il BMI è stato calcolato come peso corporeo diviso per altezza al quadrato (Kg/m^2).

Per la valutazione della composizione corporea, tutti i soggetti arruolati hanno eseguito l'analisi dell'impedenza bioelettrica (BIA) mono-frequenza (50 KHz). La resistenza (R), la reattanza (X_c) e

l'angolo di fase sono stati misurati utilizzando uno strumento BIA 101S (Akern/RIL System-Florence) [62].

4.5. Parametri laboratoristici

Per la misurazione dei parametri laboratoristici, è stato utilizzato un analizzatore di ematologia automatizzato XE-2100 (Sysmex, Kobe, Giappone) per la determinazione dell'emoglobina (Hb). Tutti i parametri di routine sono stati determinati utilizzando Dimension VISTA 1500 (Siemens Healthcare Diagnostics, Milano, Italia).

Il profilo lipidico, come il colesterolo totale (TC), i trigliceridi, la lipoproteina a bassa densità (LDL) e la lipoproteina ad alta densità (HDL), è stato determinato da tecniche colorimetriche enzimatiche standard (Roche modular P800, Diagnostica Roche, Indianapolis, IN, USA).

4.6. Questionari

Sono stati somministrati due questionari ai soggetti arruolati: PreveNcIàn con Dieta Mediterrànea (PREDIMED) [63] e International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) [64], all'inizio e alla fine dello studio. Il primo è stato somministrato per valutare l'aderenza alla dieta mediterranea, il secondo è stato somministrato per valutare il grado di attività fisica prima e dopo il trattamento con l'OFS. Entrambi i questionari sono stati somministrati al fine di escludere possibili bias legati alle abitudini alimentari o all'attività fisica sui parametri esaminati nello studio.

4.7. Attività della glutathione transferasi eritrocitaria

L'attività della e-GST è stata valutata utilizzando un'analisi spettrofotometrica a 340 nm (37 gradi centigradi), con uno spettrofotometro Uvikon 941 Plus (Kontron Instruments, Watford, Herts, Regno Unito). Poco dopo, 40 l di sangue intero sono stati diluiti in 1 ml di acqua bi distillata causando l'emolisi dell'eritrocite immediata. Dopo di che, 100 l di sangue emolizzato sono stati diluiti in un volume finale di 1 ml contenente 1 mM GSH, 1 mM CDNB in 0,1 M di tampone di potassio pH 6.5 [65]. I dati sono stati riportati come unità enzima (U) per grammo di emoglobina (Hb) (U/gHb): un'unità è la quantità di enzima che catalizza la coniugazione di 1 micromole di GSH a CDNB in 1 min a 37 gradi centigradi [66].

4.8. Albumina sierica ossidata

La HSAox è stata determinata sottraendo i valori di HSA ridotta dal totale della HSA. L'HSA ridotta è stata determinata sfruttando la reazione veloce della cistamina con Cys34, l'unica cisteina libera nell'albumina che è parzialmente presente come disulfide misto (generalmente con cisteina) a seconda dello stato redox del siero umano. La cisteamina rilasciata è stechiometrica con Cys34 e può essere determinata con DTNB ($\epsilon_{412\text{nm}} = 14.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). L'analisi è stata eseguita con uno spettrofotometro Kontron Uvikon 941 Plus (Kontron Instruments) a 412 nm a 25 gradi centigradi. Un volume di siero umano di 50 l è stato diluito in 890 l di tampone di fosfato di potassio 0,1 M pH 8,0, registrando un campione autozero. Nella soluzione sono stati quindi aggiunti 50 l di DTNB (concentrazione finale di 50 M) e 10 l di cistamina (1 mM di concentrazione finale). Dopo un'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente, l'assorbimento è stato registrato [46]. L'HSA totale è stata determinata in base ai protocolli di laboratorio standard.

4.9. Analisi statistica

I dati vengono riportati come media \pm deviazione standard per le variabili parametriche e come mediana (intervallo minimo-massimo) per le variabili non parametriche. Tutte le variabili continue sono state controllate per la normalità utilizzando il test Kolmogorov-Smirnov. Le differenze tra il baseline e i risultati finali per i valori parametrici sono state testate con un test *t* accoppiato. I dati delle variabili non parametriche sono stati analizzati per verificarsi con il test Wilcoxon. Il livello minimo di significatività delle differenze è stato fissato a $p < 0.05$. Il confronto tra gruppi è stato eseguito con ANOVA. Nel presente studio, ogni soggetto arruolato era il controllo di sé stesso. Inoltre, le brevi matrici di dati di PREDIMED e IPAQ sono state analizzate con il test di McNemar

[67]. Questa analisi è stata eseguita utilizzando il pacchetto statistico per le scienze sociali di Windows, versione 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). La visualizzazione grafica e dei risultati è stata ottenuta da GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA).

Approvazione etica: Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale del Policlinico Tor Vergata. Tutte le procedure eseguite in studi che coinvolgevano l'uomo erano conformi alla dichiarazione di Helsinki del 1964 e ai suoi successivi emendamenti o a norme etiche comparabili. Il numero di protocollo dello studio era 78/18.

Contributi degli autori: Concettualizzazione, A.N. e A.R.; metodologia, M.C. e G.C.; indagini, M.D.L.; data curation, A.B., G.M. e M.D.L.; scrittura- preparazione del progetto originale, A.N. A.B., G.M. e A.R.; scrittura-revisione e modifica, N.D.D. Tutti gli autori hanno letto e accettato la versione pubblicata del manoscritto.

Ringraziamenti: Vorremmo ringraziare la Dott.ssa Maria Paola Tanzi e Marispharma per aver fornito gratuitamente il supplemento alimentare orale Siuper[®] testato nello studio. Siamo in debito con il Dottor Roberto Sorge per l'analisi statistica e la dottoressa Georgia Wilson Jones per la revisione della lingua inglese.

Conflitti di interesse: gli autori non dichiarano alcun conflitto di interessi.

Riferimenti:

1. Bruck, K.; Stel, V.S.; Gambaro, G.; Hallan, S.; Volzke, H.; Arnlov, J.; Katarinen, M.; Guessous, I.; Vinhas, J.; Stengel, B., et al. CKD Prevalence Varies across the European General Population. *J Am Soc Nephrol* **2016**, *27*, 2135-2147, doi:10.1681/ASN.2015050542.
2. Vassalotti, J.A.; Fox, C.H.; Becker, B.N. Risk factors and screening for chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* **2010**, *17*, 237-245, doi:10.1053/j.ackd.2010.03.003.
3. Foley, R.N.; Parfrey, P.S.; Harnett, J.D.; Kent, G.M.; Murray, D.C.; Barre, P.E. Hypoalbuminemia, cardiac morbidity, and mortality in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* **1996**, *7*, 728-736.
4. Eddington, H.; Hoefield, R.; Sinha, S.; Chrysochou, C.; Lane, B.; Foley, R.N.; Hegarty, J.; New, J.; O'Donoghue, D.J.; Middleton, R.J., et al. Serum phosphate and mortality in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **2010**, *5*, 2251-2257, doi:10.2215/CJN.00810110.
5. Dessi, M.; Noce, A.; Agnoli, A.; De Angelis, S.; Fuiano, L.; Tozzo, C.; Taccone-Gallucci, M.; Fuiano, G.; Federici, G. The usefulness of the prognostic inflammatory and nutritional index (PINI) in a haemodialysis population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **2009**, *19*, 811-815, doi:10.1016/j.numecd.2009.01.009.
6. Noce, A.; Canale, M.P.; Capria, A.; Rovella, V.; Tesauro, M.; Splendiani, G.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Manzuoli, M.; Simonetti, G.; Di Daniele, N. Coronary artery calcifications predict long term cardiovascular events in non diabetic Caucasian hemodialysis patients. *Aging (Albany NY)* **2015**, *7*, 269-279, doi:10.18632/aging.100740.
7. Di Daniele, N.; Condo, S.; Ferrannini, M.; Bertoli, M.; Rovella, V.; Di Renzo, L.; De Lorenzo, A. Brown tumour in a patient with secondary hyperparathyroidism resistant to medical therapy: case report on successful treatment after subtotal parathyroidectomy. *Int J Endocrinol* **2009**, *2009*, 827652, doi:10.1155/2009/827652.
8. Cozzolino, M.; Ciceri, P.; Galassi, A.; Mangano, M.; Carugo, S.; Capelli, I.; Cianciolo, G. The Key Role of Phosphate on Vascular Calcification. *Toxins (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/toxins11040213.
9. Morrone, L.F.; Bolasco, P.; Camerini, C.; Cianciolo, G.; Cupisti, A.; Galassi, A.; Mazzaferro, S.; Russo, D.; Russo, L.; Cozzolino, M. Vitamin D in patients with chronic kidney disease: a position statement of

- the Working Group "Trace Elements and Mineral Metabolism" of the Italian Society of Nephrology. *J Nephrol* **2016**, *29*, 305-328, doi:10.1007/s40620-016-0305-6.
10. Pastore, A.; Noce, A.; Di Giovamberardino, G.; De Stefano, A.; Calla, C.; Zenobi, R.; Dessi, M.; Di Daniele, N. Homocysteine, cysteine, folate and vitamin B(1)(2) status in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. *J Nephrol* **2015**, *28*, 571-576, doi:10.1007/s40620-014-0126-4.
 11. Sarnak, M.J.; Levey, A.S.; Schoolwerth, A.C.; Coresh, J.; Culeton, B.; Hamm, L.L.; McCullough, P.A.; Kasiske, B.L.; Kelepouris, E.; Klag, M.J., et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension* **2003**, *42*, 1050-1065, doi:10.1161/01.HYP.0000102971.85504.7c.
 12. Noce A, M.G., Rovella V, Cusumano A, Di Daniele N, Casasco M Beneficial effects of physical activity on uremic sarcopenia. *Medicina Dello Sport* **2018**, *10.23736/S0025-7826.18.03389-6*, doi:10.23736/S0025-7826.18.03389-6.
 13. Moorthi, R.N.; Avin, K.G. Clinical relevance of sarcopenia in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2017**, *26*, 219-228, doi:10.1097/MNH.0000000000000318.
 14. Stenvinkel, P.; Carrero, J.J.; von Walden, F.; Ikizler, T.A.; Nader, G.A. Muscle wasting in end-stage renal disease promulgates premature death: established, emerging and potential novel treatment strategies. *Nephrol Dial Transplant* **2016**, *31*, 1070-1077, doi:10.1093/ndt/gfv122.
 15. Taccone-Gallucci, M.; Noce, A.; Bertucci, P.; Fabbri, C.; Manca-di-Villahermosa, S.; Della-Rovere, F.R.; De Francesco, M.; Lonzi, M.; Federici, G.; Scaccia, F., et al. Chronic treatment with statins increases the availability of selenium in the antioxidant defence systems of hemodialysis patients. *J Trace Elem Med Biol* **2010**, *24*, 27-30, doi:10.1016/j.jtemb.2009.06.005.
 16. Ravarotto, V.; Simioni, F.; Pagnin, E.; Davis, P.A.; Calo, L.A. Oxidative stress - chronic kidney disease - cardiovascular disease: A vicious circle. *Life Sci* **2018**, *210*, 125-131, doi:10.1016/j.lfs.2018.08.067.
 17. Raha, S.; Robinson, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* **2000**, *25*, 502-508, doi:10.1016/s0968-0004(00)01674-1.
 18. Small, D.M.; Coombes, J.S.; Bennett, N.; Johnson, D.W.; Gobe, G.C. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* **2012**, *17*, 311-321, doi:10.1111/j.1440-1797.2012.01572.x.
 19. Bocedi, A.; Noce, A.; Marrone, G.; Noce, G.; Cattani, G.; Gambardella, G.; Di Lauro, M.; Di Daniele, N.; Ricci, G. Glutathione Transferase P1-1 an Enzyme Useful in Biomedicine and as Biomarker in Clinical Practice and in Environmental Pollution. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11081741.
 20. Raimann, J.G.; Levin, N.W.; Craig, R.G.; Sirover, W.; Kotanko, P.; Handelman, G. Is vitamin C intake too low in dialysis patients? *Semin Dial* **2013**, *26*, 1-5, doi:10.1111/sdi.12030.
 21. Gillis, K.; Stevens, K.K.; Bell, E.; Patel, R.K.; Jardine, A.G.; Morris, S.T.W.; Schneider, M.P.; Delles, C.; Mark, P.B. Ascorbic acid lowers central blood pressure and asymmetric dimethylarginine in chronic kidney disease. *Clin Kidney J* **2018**, *11*, 532-539, doi:10.1093/ckj/sfx158.
 22. Jankowska, M.; Rutkowski, B.; Debska-Slizien, A. Vitamins and Microelement Bioavailability in Different Stages of Chronic Kidney Disease. *Nutrients* **2017**, *9*, doi:10.3390/nu9030282.
 23. Touyz, L.Z. The vitamin C content of foods. *J Dent Assoc S Afr* **1982**, *37*, 445-448.
 24. Marmol, I.; Sanchez-de-Diego, C.; Jimenez-Moreno, N.; Ancin-Azpilicueta, C.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Therapeutic Applications of Rose Hips from Different Rosa Species. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18061137.

25. Di Renzo, L.; Gualtieri, P.; Romano, L.; Marrone, G.; Noce, A.; Pujia, A.; Perrone, M.A.; Aiello, V.; Colica, C.; De Lorenzo, A. Role of Personalized Nutrition in Chronic-Degenerative Diseases. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11081707.
26. Noce, A.; Marrone, G.; Di Lauro, M.; Urciuoli, S.; Pietroboni-Zaitseva, A.; Wilson-Jones, G.; Di Daniele, N.; Romani, A. Cardiovascular Protection of Nephropathic Male Patients by Oral Food Supplements. *Cardiovascular Therapeutics* **2020**, in press.
27. Ahbap, E.; Sakaci, T.; Kara, E.; Sahutoglu, T.; Koc, Y.; Basturk, T.; Sevinc, M.; Akgol, C.; Kayalar, A.O.; Ucar, Z.A., et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in evaluation of inflammation in end-stage renal disease. *Clin Nephrol* **2016**, *85*, 199-208, doi:10.5414/CN108584.
28. Noce, A.; Rovella, V.; Marrone, G.; Cattani, G.; Zingaretti, V.; Limongi, D.; D'Agostini, C.; Sorge, R.; Casasco, M.; Di Daniele, N., et al. Hemodialysis biomarkers: total advanced glycation end products (AGEs) against oxidized human serum albumin (HSAox). *Acta Diabetol* **2019**, 10.1007/s00592-019-01413-7, doi:10.1007/s00592-019-01413-7.
29. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* **2005**, *53*, 1841-1856, doi:10.1021/jf030723c.
30. Ninfali, P.; Mea, G.; Giorgini, S.; Rocchi, M.; Bacchiocca, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *Br J Nutr* **2005**, *93*, 257-266, doi:10.1079/bjn20041327.
31. Romani, A.; Lapucci, C.; Cantini, C.; Ieri, F.; Mulinacci, N.; Visioli, F. Evolution of minor polar compounds and antioxidant capacity during storage of bottled extra virgin olive oil. *J Agric Food Chem* **2007**, *55*, 1315-1320, doi:10.1021/jf062335r.
32. Akbas, E.M.; Gungor, A.; Ozcicek, A.; Akbas, N.; Askin, S.; Polat, M. Vitamin D and inflammation: evaluation with neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio. *Arch Med Sci* **2016**, *12*, 721-727, doi:10.5114/aoms.2015.50625.
33. Ishigami, J.; Matsushita, K. Clinical epidemiology of infectious disease among patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* **2019**, *23*, 437-447, doi:10.1007/s10157-018-1641-8.
34. Mischler, K.; Fischer, J.E.; Zraggen, L.; Kudielka, B.M.; Preckel, D.; von Kanel, R. The effect of repeated acute mental stress on habituation and recovery responses in hemoconcentration and blood cells in healthy men. *Life Sci* **2005**, *77*, 1166-1179, doi:10.1016/j.lfs.2005.03.006.
35. Ortega, O.; Rodriguez, I.; Gallar, P.; Carreno, A.; Ortiz, M.; Espejo, B.; Jimenez, J.; Gutierrez, M.; Oliet, A.; Vigil, A. Significance of high C-reactive protein levels in pre-dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* **2002**, *17*, 1105-1109, doi:10.1093/ndt/17.6.1105.
36. Stenvinkel, P.; Heimbürger, O.; Paultre, F.; Diczfalusy, U.; Wang, T.; Berglund, L.; Jogestrand, T. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* **1999**, *55*, 1899-1911, doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00422.x.
37. Mariani, E.; Cattini, L.; Neri, S.; Malavolta, M.; Mocchegiani, E.; Ravaglia, G.; Facchini, A. Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status. *Biogerontology* **2006**, *7*, 449-459, doi:10.1007/s10522-006-9060-8.
38. Prasad, A.S. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med* **2008**, *14*, 353-357, doi:10.2119/2008-00033.Prasad.
39. Fraker, P.J.; King, L.E. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu Rev Nutr* **2004**, *24*, 277-298, doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132454.
40. LARN. Low Nourishment of Vitamin C Induces Glutathione Depletion and Oxidative Stress in Healthy Young Adults. Available online: (accessed on 10 June).

41. Aarland, R.C.; Banuelos-Hernandez, A.E.; Fragoso-Serrano, M.; Sierra-Palacios, E.D.; Diaz de Leon-Sanchez, F.; Perez-Flores, L.J.; Rivera-Cabrera, F.; Mendoza-Espinoza, J.A. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycaemic and antiproliferative activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* extracts. *Pharm Biol* **2017**, *55*, 649–656, doi:10.1080/13880209.2016.1265989.
42. Tragni, E.; Galli, C.L.; Tubaro, A.; Del Negro, P.; Della Loggia, R. Anti-inflammatory activity of *Echinacea angustifolia* fractions separated on the basis of molecular weight. *Pharmacol Res Commun* **1988**, *20 Suppl 5*, 87–90, doi:10.1016/s0031-6989(88)80848-8.
43. Chrubasik, C.; Roufogalis, B.D.; Muller-Ladner, U.; Chrubasik, S. A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phytother Res* **2008**, *22*, 725–733, doi:10.1002/ptr.2400.
44. Winther, K.; Rein, E.; Kharazmi, A. The anti-inflammatory properties of rose-hip. *Inflammopharmacology* **1999**, *7*, 63–68, doi:10.1007/s10787-999-0026-8.
45. Wenzig, E.; Widowitz, U.; Kunert, O.; Bauer, R.; Chrubasik, S. In vitro COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitory activity of rose hips (*Rosae pseudofructus sine fructibus*). *Planta Medica* **2007**, *73*.
46. Bocedi, A.; Noce, A.; Rovella, V.; Marrone, G.; Cattani, G.; Iappelli, M.; De Paolis, P.; Iaria, G.; Sforza, D.; Gallu, M., et al. Erythrocyte glutathione transferase in kidney transplantation: a probe for kidney detoxification efficiency. *Cell Death Dis* **2018**, *9*, 288, doi:10.1038/s41419-018-0289-3.
47. Noce, A.; Ferrannini, M.; Fabrini, R.; Bocedi, A.; Dessi, M.; Galli, F.; Federici, G.; Palumbo, R.; Di Daniele, N.; Ricci, G. Erythrocyte glutathione transferase: a new biomarker for hemodialysis adequacy, overcoming the Kt/V(urea) dogma? *Cell Death Dis* **2012**, *3*, e377, doi:10.1038/cddis.2012.112.
48. Carrero, J.J.; Grams, M.E.; Sang, Y.; Amlöv, J.; Gasparini, A.; Matsushita, K.; Qureshi, A.R.; Evans, M.; Barany, P.; Lindholm, B., et al. Albuminuria changes are associated with subsequent risk of end-stage renal disease and mortality. *Kidney Int* **2017**, *91*, 244–251, doi:10.1016/j.kint.2016.09.037.
49. Miranda, C.L.; Reed, R.L.; Kuiper, H.C.; Alber, S.; Stevens, J.F. Ascorbic acid promotes detoxification and elimination of 4-hydroxy-2(E)-nonenal in human monocytic THP-1 cells. *Chem Res Toxicol* **2009**, *22*, 863–874, doi:10.1021/tx900042u.
50. Waly, M.I.; Al-Attabi, Z.; Guizani, N. Low Nourishment of Vitamin C Induces Glutathione Depletion and Oxidative Stress in Healthy Young Adults. *Prev Nutr Food Sci* **2015**, *20*, 198–203, doi:10.3746/pnf.2015.20.3.198.
51. Gao, S.; Liu, J. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and atherosclerotic cardiovascular disease. *Chronic Dis Transl Med* **2017**, *3*, 89–94, doi:10.1016/j.cdtm.2017.02.008.
52. Singh, A.K.; Singh, R. Triglyceride and cardiovascular risk: A critical appraisal. *Indian J Endocrinol Metab* **2016**, *20*, 418–428, doi:10.4103/2230-8210.183460.
53. Nordestgaard, B.G.; Varbo, A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet* **2014**, *384*, 626–635, doi:10.1016/S0140-6736(14)61177-6.
54. Ninomiya, K.; Matsuda, H.; Kubo, M.; Morikawa, T.; Nishida, N.; Yoshikawa, M. Potent anti-obese principle from *Rosa canina*: structural requirements and mode of action of trans-tiliroside. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 3059–3064, doi:10.1016/j.bmcl.2007.03.051.
55. Gonzalez, I.; Escobar, M.; Olivera, P. Plasma lipids of golden Syrian hamsters fed dietary rose hip, sunflower, olive and coconut oils. *Rev Esp Fisiol* **1997**, *53*, 199–204.
56. Goddard, A.F.; James, M.W.; McIntyre, A.S.; Scott, B.B.; British Society of, G. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut* **2011**, *60*, 1309–1316, doi:10.1136/gut.2010.228874.
57. Prinsen, B.H.; de Sain-van der Velden, M.G.; Kaysen, G.A.; Straver, H.W.; van Rijn, H.J.; Stellaard, F.; Berger, R.; Rabelink, T.J. Transferrin synthesis is increased in nephrotic patients insufficiently to replace urinary losses. *J Am Soc Nephrol* **2001**, *12*, 1017–1025.

58. Chen, W.; Abramowitz, M.K. Metabolic acidosis and the progression of chronic kidney disease. *BMC Nephrol* **2014**, *15*, 55, doi:10.1186/1471-2369-15-55.
59. Kopple, J.D.; Kalantar-Zadeh, K.; Mehrotra, R. Risks of chronic metabolic acidosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* **2005**, 10.1111/j.1523-1755.2005.09503.x, S21-27, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.09503.x.
60. Kopple, J.D. National kidney foundation K/DOQI clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* **2001**, *37*, S66-70.
61. Lohman, T., G.; Roche, A., F.; Reynaldo Martorell, H., M. *Anthropometric standardization reference manual*; IL, 1988.
62. Bellizzi, V.; Scalfi, L.; Terracciano, V.; De Nicola, L.; Minutolo, R.; Marra, M.; Guida, B.; Cianciaruso, B.; Conte, G.; Di Iorio, B.R. Early changes in bioelectrical estimates of body composition in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **2006**, *17*, 1481-1487, doi:10.1681/ASN.2005070756.
63. Martinez-Gonzalez, M.A.; Garcia-Arellano, A.; Toledo, E.; Salas-Salvado, J.; Buil-Cosiales, P.; Corella, D.; Covas, M.I.; Schroder, H.; Aros, F.; Gomez-Gracia, E., et al. A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PLoS One* **2012**, *7*, e43134, doi:10.1371/journal.pone.0043134.
64. Wanner, M.; Probst-Hensch, N.; Kriemler, S.; Meier, F.; Autenrieth, C.; Martin, B.W. Validation of the long international physical activity questionnaire: Influence of age and language region. *Prev Med Rep* **2016**, *3*, 250-256, doi:10.1016/j.pmedr.2016.03.003.
65. Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **1974**, *249*, 7130-7139.
66. Dessi, M.; Noce, A.; Dawood, K.F.; Galli, F.; Taccone-Gallucci, M.; Fabrini, R.; Bocedi, A.; Massoud, R.; Fucci, G.; Pastore, A., et al. Erythrocyte glutathione transferase: a potential new biomarker in chronic kidney diseases which correlates with plasma homocysteine. *Amino Acids* **2012**, *43*, 347-354, doi:10.1007/s00726-011-1085-x.
67. Xiang, J.X. On two-sample McNemar test. *J Biopharm Stat* **2016**, *26*, 217-226, doi:10.1080/10543406.2014.1000548.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).