



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA TOR VERGATA

*FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE E
CHIRURGIA*

MASTER DI II LIVELLO IN: “NUTRIZIONE PERSONALIZZATA: BASI MOLECOLARI E GENETICHE”

Anno Accademico 2017-18

*Valutazione della possibile azione di due
integratori naturali sulla capacità antiossidante e
detossificante in pazienti nefropatici, attraverso il
monitoraggio di due biomarcatori.*

Docente guida:

Prof.ssa Annalisa Noce

Candidato:

Dr.ssa Sara Leo

Abstract

- 1. Introduzione**
- 2. Scopo del lavoro**
- 3. Materiali e metodi**
- 4. Risultati**
- 5. Discussione e conclusioni**
- 6. Bibliografia**

Abstract

Nei pazienti affetti da insufficienza renale cronica, numerosi studi hanno dimostrato la presenza di uno stato infiammatorio cronico di lieve entità e l'incremento dello stress ossidativo (SO). Lo SO viene generalmente definito come uno squilibrio tra la produzione delle sostanze antiossidanti e quelle ossidanti, a favore di queste ultime. La produzione di sostanze ossidanti in tali pazienti sembrerebbe avvenire in risposta agli stimoli infiammatori normalmente presenti. Infatti una impropria attivazione dei processi ossidativi sembrerebbe essere presente in situazioni patologiche, tra cui l'ipertensione arteriosa sistemica e l'insufficienza renale cronica (IRC), contribuendo al danno tissutale e cellulare. I pazienti ipertesi ed affetti da IRC sono caratterizzati da un ulteriore incremento dei biomarcatori di infiammazione e di stress ossidativo (per la ridotta disponibilità di vitamina C e selenio, per riduzione dei livelli di vitamina E ed infine per la ridotta attività del sistema antiossidante del glutatione) e da una aumentata capacità pro-ossidante (età avanzata, elevata frequenza di diabete mellito e per la bioincompatibilità verso le membrane ed i liquidi di dialisi).

In commercio sono disponibili due integratori in grado probabilmente di coadiuvare l'azione antiossidante e detossificante presente negli uremici: Siuper (S) e Bellen (B).

Tutte le sostanze presenti nel Siuper (*Echinacea angustifolia* DC radice, *Rosa canina* frutti, propoli, pappa reale, zinco) favoriscono l'azione antiossidante ed inoltre, il complesso fitoterapico in toto, aiuta l'assorbimento da parte dell'organismo dei suoi numerosi principi attivi. Le cinque sostanze costituenti l'integratore sono altamente antiossidanti ed è proprio la loro interazione che ne potenzia l'attività. Il prodotto è indicato in tutte quelle condizioni in cui si richiede un incremento dell'azione detossificante dell'organismo.

Il secondo integratore alimentare considerato nel presente studio, è stato il Bellen (*Centella asiatica* L. foglie, *Aesculus hippocastanum* L. corteccia, *Capsicum annuum* L. frutti, *Cynara scolymus* L. foglie, *Garcinia cambogia* Desr. frutto), la cui azione antiossidante è stata valutata mediante test ORAC. L'integratore Bellen, che tra i suoi ingredienti vanta composti ad attività antiossidante come il capsico, apporta circa 240 unità ORAC per grammo di prodotto ossia un decimo del fabbisogno giornaliero. L'attività antiossidante dell'estratto utilizzato nell'integratore, è pari a due volte quella del frutto disidratato e venti volte quella del frutto fresco (test condotto dalla ditta produttrice).

Gli acidi tra cui il caffeico e il chinico, presenti nelle foglie del carciofo, svolgono attività sulla diuresi, stimolando in senso fisiologico la funzione cellulare e la secrezione epatica. L'acido clorogenico (titolato al 7% nel prodotto) attiva il fitocomplesso. L'attività epatoprotettiva del carciofo è dovuta principalmente alla cinarina. La Garcinia, nel prodotto è titolata al 60% in acido idrossicitrico (HCA), agisce inibendo la citrato-liasi, enzima deputato all'esporto citoplasmatico di acetil-CoA, proveniente dai mitocondri e "starter" della liposintesi endogena. Inibendo la citrato-liasi, l'HCA della *Garcinia cambogia* inibisce la liposintesi endogena, con un effetto ipolipemizzante. Fondamentale è il dosaggio del prodotto fitoterapico e le sinergie tra i vari principi attivi. Le azioni descritte rendono il fitocomplesso Bellen particolarmente indicato per migliorare i processi di detossificazione cellulare.

Allo scopo di valutare l'azione di tali integratori sul possibile miglioramento dello stress ossidativo e sullo stato di salute nei pazienti nefropatici, sono stati utilizzati due biomarcatori quali la glutatione trasferasi eritrocitaria (e-GST) e la siero albumina ossidata (HSAox). Gli eritrociti esprimono soltanto una singola isoforma, la GSTP1-1 (chiamata anche e-GST). L'overespressione della e-GST è determinata da un aumento delle tossine ematiche presenti nell'organismo (Bocedi et al., 2018). La e-GST rappresenta un efficace biomarcatore a lungo termine (tre settimane), come è stato già descritto in letteratura. Il secondo biomarcatore utilizzato è la HSAox, in particolare si fa riferimento al suo stato ossidato dell'unica cisteina libera (^{34}Cys) in forma di disolfuro misto con i tioli del plasma. La siero albumina è la più abbondante proteina plasmatica ed è quindi un biomarcatore di elezione dello stress ossidativo a breve termine (due giorni).

1. Introduzione

Le malattie renali acute e croniche comprendono uno spettro di disturbi che vengono definiti da indicazioni sulla struttura renale, la durata della malattia, la funzionalità indipendentemente dalle cause responsabili di malattia renale.

La malattia renale cronica (CKD) è un problema mondiale di salute pubblica, che si manifesta con una perdita progressiva della funzionalità renale e con complicanze precoci quali insufficienza renale, malattia cardiovascolare (CVD) e morte prematura (**Figura 1**) (Levey et al., 2005).

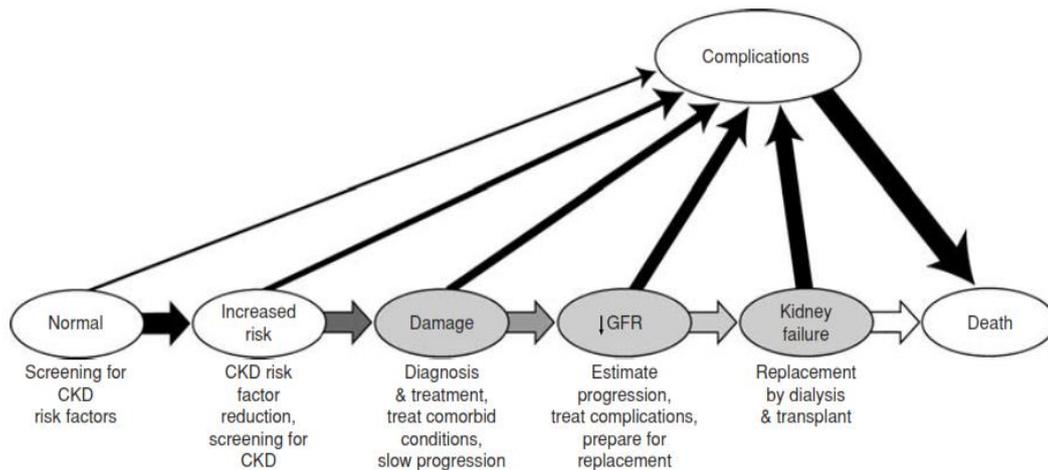


Figura 1: Modello concettuale del decorso della malattia renale cronica (CKD)

Le ellissi ombreggiate rappresentano le fasi della CKD. Le ellissi non ombreggiate rappresentano potenziali antecedenti o conseguenze della CKD. Le frecce spesse tra le ellissi rappresentano i fattori di rischio associati all'iniziazione e alla progressione di malattia che può essere influenzata o rilevata dagli interventi: fattori di suscettibilità (nero), fattori di iniziazione (grigio scuro), fattori di progressione (grigio chiaro), e fattori di stadio finale (bianco). Gli interventi per ogni fase sono indicati sotto ogni ellisse. Le persone che sembrano normali dovrebbero essere sottoposte a screening per i fattori di rischio CKD. Le persone note per essere a maggior rischio di CKD dovrebbero essere sottoposte a screening per CKD. "Complicanze" si riferisce a tutte le complicanze di CKD e suo trattamento, comprese le complicanze della diminuzione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) (ipertensione, anemia, malnutrizione, patologia ossea, neuropatia e diminuzione della qualità della vita) e malattie cardiovascolari (CVD). L'aumento dello spessore delle frecce che collegano fasi successive a complicazioni è indice di aumentato rischio di complicanze con il progredire della malattia renale. (Levey et al., 2015).

La malattia renale cronica (CKD) è caratterizzata da una diminuzione della GFR da più di tre mesi o dall'evidenza di danno renale. Segnali di danno renale includono albuminuria, anormalità dei sedimenti urinari, anomalie elettrolitiche correlate a disturbi tubulari o anomalie strutturali rilevate istologicamente o con tecniche di *imaging*. (Levey et al., 2015)

La CKD viene classificata per causa e gravità delle anormalità renali presenti, con stadi più gravi corrispondenti a una prognosi peggiore, in base alla "nomenclatura CGA": causa (C), livello di GFR (G), albuminuria (A) (Levey et al., 2015). La gravità della malattia renale è classificabile in cinque stadi in base al livello di GFR (**Figura 2**, Inker et al., 2014).

La CKD è caratterizzata da danno renale quando il tasso di filtrazione glomerulare (GFR) è inferiore ai 60 ml/min/1,73 m² per 3 mesi o più, indipendentemente dalla causa. Il danno renale in molte CKD può essere accertato dalla presenza di albuminuria, definita come rapporto albuminuria/creatininuria superiore ai 30 mg/g in 2/3 campioni di urina prodotti.

Il tasso di filtrazione glomerulare ovvero GFR rappresenta il miglior indice di funzionalità renale; quest'ultima infatti può essere stimata (*estimated GFR*, eGFR) da un'equazione calibrata con la creatinina sierica e da equazioni stimanti come la formula di Cockcroft-Gault, la Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) e la formula CKD-EPI. L'equazione MDRD e più recentemente l'equazione CKD-EPI hanno dimostrato essere più accurate dell'equazione di Cockcroft e Gault, per cui sono ora le più riportate automaticamente dai laboratori clinici ogni volta che viene misurata la creatinina (Levey et al., 2010).

GFR category	GFR (ml/min/1.73 m ²)	Terms
G1	≥ 90	Normal or high
G2	60-89	Mildly decreased*
G3a	45-59	Mildly to moderately decreased
G3b	30-44	Moderately to severely decreased
G4	15-29	Severely decreased
G5	< 15	Kidney failure

Abbreviations: CKD, chronic kidney disease; GFR, glomerular filtration rate.

*Relative to young adult level.

In the absence of evidence of kidney damage, neither GFR category G1 nor G2 fulfill the criteria for CKD.

Figura 2: Stadiazione Malattia Renale Cronica (CKD).

Abbreviazioni: GFR=tasso di filtrazione glomerulare (Fonte: Inker et al., 2014).

La terapia dietetico nutrizionale (TDN) dei pazienti con insufficienza renale cronica in terapia conservativa, è opinione diffusa tra i nefrologi e va iniziata quando la clearance della creatinina è inferiore a 60 mL/min/1,73 m². Non è stato identificato un momento preciso in cui iniziare la TDN e non è noto se un intervento dietetico precoce sia preferibile a uno tardivo. Nella pratica clinica, l'utilizzo della TDN ha una distribuzione piuttosto irregolare e i nefrologi che la utilizzano raccomandano un intervento sulle abitudini alimentari quando la clearance della creatinina è inferiore a 60 mL/min/1,73 m² (stadio 3 CKD) e una dieta strutturata a ridotto apporto proteico (0,6-0,7g/Kg/die) per valori di filtrato

glomerulare inferiori a 30 mL/min/1,73 m² (stadio 4 CKD) (D'Alessandro et al., 2016).

Alla riduzione del filtrato glomerulare si associano alterazioni del rimaneggiamento renale di diversi prodotti del metabolismo (urea, acidi organici ed inorganici ecc.) e di micronutrienti introdotti con la dieta (fosforo, sodio, potassio ecc.). Iperparatiroidismo e relativi iperfosforemia e ipercalcemia, acidosi metabolica, e squilibri idro-elettrolitici che includono iperpotassiemia, ipernatriemia sono evidenti già nello stadio CKD 3, e il PTH è aumentato sin dalle fasi precoci dell'insufficienza renale cronica (IRC).

Altrettanto precocemente compaiono numerosi fattori modificabili di rischio cardio-renale come ipertensione, espansione dei fluidi extracellulari, dislipidemia, proteinuria e alterazioni del metabolismo calcio-fosforo.

Una quota obbligata di fosforo viene introdotta con le proteine in misura di 13 mg/g di proteine. La TDN non dovrebbe mirare soltanto a ridurre il carico alimentare di proteine e fosfati ma considerare anche l'introito di sodio e la possibilità di controllo della dislipidemia. La TDN dovrebbe prevedere l'uso di prodotti ipoproteici, i quali non solo riducono la quantità di fosforo dietetico ma aumentano il rapporto energia/fosforo. L'energia rappresenta infatti il fattore limitante. Nei prodotti ipoproteici, il rapporto energia/fosforo è molto più alto (Quintaliani, 2012).

La valutazione dello Stato Nutrizionale prevede l'uso di (Quintaliani, 2012):

- misure antropometriche, comprendenti la valutazione del peso corporeo, dell'altezza, del BMI e alcuni dati antropometrici (De Oliveira et al., 2012);
- composizione corporea, attraverso l'utilizzo della Bioimpedenzometria (BIA) anche se presenta dei limiti nel paziente con CKD, in quanto la distribuzione dei liquidi corporei è differente rispetto al soggetto normale. La BIA non è stata validata per una valutazione della composizione corporea, ma per la componente idrica dell'organismo. La BIA, per il basso costo, la riproducibilità, e il facile impiego ben si presta alla valutazione in follow up del paziente e soprattutto del carico idrico (utilizzo della DEXA ma dato il costo elevato del macchinario e dell'esame, l'utilizzo è limitato);
- indicatori biochimici dello stato di nutrizione. Fra i parametri bio-umorali dello stato nutrizionale, si suggerisce il monitoraggio di albumina, pre-

albumina, transferrina, IGF-1, colesterolo, proteina legante il retinolo e infine anche il C3 può rivestire un significato prognostico in alcune situazioni;

- valutazione dietetica. In tale contesto viene effettuata la valutazione dell'introito dietetico che deve precedere qualunque intervento nutrizionale attraverso l'utilizzo di Questionari di Aderenza alla Dieta Mediterranea (PREDIMED) e questionario delle frequenze (Food Frequency, FF). La valutazione dei livelli di attività fisica determinati attraverso un questionario validato (IPAQ).

Il questionario somministrato per valutare l'aderenza a un modello dietetico di buona qualità (dieta mediterranea) è stato il 14-quesiti sviluppato nel 2014 da Martínez-Gonzales e collaboratori nello studio trasversale "Prevention con Dieta MEDiterranea" (PREDIMED). Il PREDIMED mostra un indice di aderenza che va da 0-14, dove la somma del punteggio che cade tra 0-5 è indice di scarsa aderenza, tra 6-10 l'aderenza è media e tra 10-14 l'aderenza è buona o massima.

Il questionario somministrato per la valutazione dei livelli di attività fisica è stato l'International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) pubblicato da Craig e collaboratori nel 2003. IPAQ ha buone proprietà per il monitoraggio dei livelli di attività fisica tra una popolazione di adulti dai 18 ai 65 anni. Il breve modulo IPAQ "last 7 d recall" è raccomandato per il monitoraggio a livello nazionale e per le ricerche che richiedono una valutazione più dettagliata.

L'angolo di fase espresso attraverso la bioimpedenza elettrica, è stato studiato come marcatore prognostico in diverse condizioni di salute. È ancora aperto il dibattito del possibile utilizzo dell'angolo di fase in correlazione alla mortalità in diverse patologie. Da una review sistematica di Garlini e collaboratori (2018), l'angolo di fase sembra essere un buon indicatore per la mortalità in molte situazioni cliniche e può dunque essere utilizzato nello screening.

La glutatione trasferasi eritrocitaria di classe P1-1 o e-GST è un enzima umano intracellulare omodimerico di 46 kDa e rappresenta la il 95% del pool intraeritrocitario di GST. In generale la superfamiglia degli isoenzimi glutatione trasferasi (GSTs), promuove la coniugazione del glutatione con molti composti tossici di differente natura chimica esogeni ed endogeni e favorisce la loro escrezione. Le GSTs umane a localizzazione citosolica sono raggruppate in 7 classi indipendenti di geni indipendenti: *alpha* (A), *mu* (M), *pi* (P), *theta* (T), *omega* (O), *sigma* (S), *Zeta* (Z). La sottoclasse GSTP1-1 sembra avere un controllo sia sulle vie

di segnalazione cellulare che sulle vie trascrizionali attraverso meccanismi di interazione proteina-proteina (Bartolini et al., 2016). Esistono attivatori trascrizionali classici del gene *GSTP* tra cui xenobiotici e chemioterapici, inoltre sono presenti attivatori endogeni come le tossine prodotte dal *deficit* funzionale di organi depurativi come fegato e rene. Un importante incremento dei livelli di eGST (12.7 ± 0.5 U/g_{Hb}) è stato osservato in pazienti con valori di eGFR < 60 ml/min, rispetto a pazienti con funzionalità renale superiore ai 60 ml/min (9.1 ± 0.5 U/g_{Hb}) (Bocedi et al., 2018).

eGST rappresenta una sonda efficiente dell'esposizione a lungo termine a tossine endogene ed esogene. Elevati livelli sono stati riscontrati in pazienti nefropatici come così come in soggetti in salute che vivono in aree inquinate, dove le tossine ematiche sono veramente elevate (Bocedi et al., 2016). Inoltre e-GST correla positivamente con i livelli di omocisteina plasmatici, come è stato osservato in studi su pazienti uremici con diabete DMT2 mantenuti in terapia emodialitica. L'omocisteina incrementa in relazione allo stadio di CKD e l'iperattività di e-GST si è visto non sembra essere correlata al diabete bensì probabilmente al livello di danno renale e entrambi potrebbero rappresentare marcatori precoci dell'insufficienza renale (Noce et al., 2014). Sorprendentemente è stato osservato un aumento statisticamente significativo dell'attività di e-GST in pazienti diabetici anche in assenza di un aumento dei biomarker tradizionali di danno renale, ovvero di albuminuria (Noce et al., 2015).

L'albumina sierica umana (HSA) rappresenta la principale proteina plasmatica (0.6-0.8 mM) ed è caratterizzata da 17 legami disolfuro e solo una Cys libera la Cys34. La Cys34 può trovarsi in forma libera quando l'albumina è in forma ridotta. Nell'albumina in forma ossidata (HSAox), Cys34 è impegnata in un legame disolfuro reversibile con altri tioli naturalmente presenti nel plasma (p.e. cistina, omocisteina, cistamina, GSSG). Nei soggetti in salute, questo residuo è presente principalmente (70%) in forma ridotta mentre il 25-30% è presente in forma ossidata (HSAox) con cisteine libere, e in minor quantità con cisteinilglicina, omocisteina e GSH. Le forme ossidate irreversibili di HSA sotto forma di sulfinato e sulfonato sono notevolmente minori pari a 3-4% (Bocedi et al., 2018). L'albumina ossidata rappresenta il migliore biomarcatore di stress ossidativo a breve termine in relazione a diverse condizioni patologiche come diabete mellito,

malattia renale ed epatica, nelle quali tende ad innalzarsi anche in relazione alla progressione della malattia (Nagumo et al., 2014).

2. Scopo del lavoro

Lo studio si propone di valutare l'azione di due distinti integratori (Siuper e Bellen) sul possibile miglioramento dello stress ossidativo e sullo stato di salute, in un gruppo di pazienti affetti da insufficienza renale cronica in terapia conservativa e in un gruppo di controllo costituito da soggetti sani.

3. Materiali e metodi

Sede dello studio

L'attuale studio è stato condotto presso gli ambulatori di Nefrologia e Ipertensione della U.O.C di Medicina Interna – Nefrologia e Dialisi diretta dal prof. Nicola Di Daniele, afferente al Dipartimento di Medicina dei Sistemi, dell'Azienda Ospedaliera “Policlinico di Tor Vergata” di Roma, e presso il laboratorio di biochimica del Prof.re Giorgio Ricci del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche presso la facoltà di Scienze Matematiche fisiche e Naturali dell'Università di Roma Tor Vergata.

Numero di pazienti da arruolare

Trattandosi di uno studio pilota non è possibile effettuare un calcolo statistico della numerosità campionaria, per assenza di statistiche atte allo scopo.

Si prevede di arruolare un totale di 60 soggetti così distinti:

- 30 in terapia conservativa;
- 30 soggetti sani (gruppo di controllo).

Disegno sperimentale

Studio in aperto su integratori alimentari che utilizza biomarcatori quali fattori prognostici predittivi della durata complessiva di dodici mesi da Settembre 2018 a Settembre 2019.

La raccolta del campione ematico verrà eseguita nell'ambito di un prelievo ematico di routine per i pazienti nefropatici, mentre per i soggetti sani verrà effettuato un prelievo ematico ad hoc. Per i pazienti nefropatici un'aliquota aggiuntiva di sangue verrà processata secondo le indicazioni successivamente

riportate. I pazienti eseguiranno inoltre un esame bioimpedenziometrico al fine di valutare le eventuali variazioni della composizione corporea e nello specifico l'angolo di fase, che sembrerebbe variare in relazione stress ossidativo.

I controlli sono stati eseguiti al tempo di arruolamento (T0), una settimana dopo (T1), due settimane dopo (T2) e tre settimane dopo (T3).

Al termine dello studio i campioni ematici dello studio verranno distrutti. I dati anagrafici e clinici relativi dei pazienti in studio sono stati raccolti in un database in foglio di calcolo Excel, presso l'UOC di Ipertensione e Nefrologia del Policlinico Universitario "Tor Vergata" nel rispetto della normativa vigente sul trattamento dei dati personali (D. Lgs 196/2003).

Gli integratori utilizzati nello studio "Siuper" (S) e "Bellen" (B) sono stati forniti gratuitamente dalla ditta produttrice Marispharma S.r.l. (Via Lago d'Iseo 2, Frosinone).

I 60 pazienti sono stati selezionati secondo modalità randomizzata per inserirli nel gruppo dell'integratore S oppure B. Il 50% di ogni sottogruppo (pazienti in terapia conservativa e soggetti sani) assumerà S in capsule 3 cps/die e l'altro 50% assumerà B 3 cps/die.

Lo studio per i pazienti nefropatici è stato distinto nelle seguenti fasi:

- I. T0: monitoraggio plasmatico dei parametri di routine e della Glutazione Trasferasi eritrocitaria (e-GST) e dell'albumina ossidata (HSAox); esame bioimpedenziometrico, misurazione della pressione arteriosa e questionari Food Frequency (FF), PREDIMED e questionario sui livelli di attività fisica (IPAQ);
- II. T1: monitoraggio plasmatico della e-GST e HSAox; esame bioimpedenziometrico, misurazione della pressione arteriosa;
- III. T2: monitoraggio plasmatico della e-GST e HSAox, esame bioimpedenziometrico, misurazione della pressione arteriosa;
- IV. T3: monitoraggio plasmatico dei parametri di routine e della e-GST e HSAox, esame bioimpedenziometrico, misurazione della pressione arteriosa e questionari Food Frequency (FF), PREDIMED e questionario sui livelli di attività fisica (IPAQ);

Popolazione oggetto di studio

La popolazione oggetto di studio sarà costituita da:

- pazienti affetti da insufficienza renale cronica in terapia conservativa

- soggetti sani (gruppo di controllo)

Al momento i dati preliminari (lo studio non è concluso), sono focalizzati sulla sola popolazione di pazienti con IRC in terapia conservativa, le cui caratteristiche demografiche sono indicate in **Tabella 1**.

Criteri di inclusione:

I criteri di inclusione per i pazienti nefropatici sono:

- soggetti con IRC stadio I-IV secondo le linee K-DIGO (in terapia conservativa);
- età superiore a 18 anni, ambo i sessi.

Per il gruppo di controllo verranno arruolati soggetti sani di età superiore ai 18 anni, di entrambi i sessi.

Criteri di esclusione

- soggetti con neoplasie in corso o da meno di 5 anni;
- soggetti affetti da HIV, HbsAg+ HCV+;
- non accettazione del consenso informato;
- soggetti con epatopatie;
- -soggetti in terapia non conservativa (dialisi);
- soggetti con patologie infiammatorie e/o infettive in fase acuta;
- soggetti malnutriti (BMI<18.5);
- soggetti con allergie respiratorie da pollini;

Metodologia

Tutti i pazienti sono stati informati di essere sottoposti a prelievi di sangue ai fini della ricerca della Glutazione Trasferasi eritrocitaria (e-GST) e dell'albumina ossidata sierica (HSAox):

- I dosaggi per la e-GST consistono nel prelievo di sangue (5 ml) in una provetta da emocromo K₃EDTA da conservare a +4° C. Data la particolare stabilità della e-GST il dosaggio può essere effettuato entro 7 giorni dal prelievo. Il livello di e-GST è stato dosato spettrofotometricamente a 340 nm e 37°C su sangue emolizzato con 0.1M di tampone potassio-fosfato (pH 6.5) e l'utilizzo dei due co-substrati: glutazione (GSH, 1 mM) e di 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, 1 mM);
- Il saggio della HSAox prevede una modesta quantità di siero da far reagire prontamente con il reattivo di Ellman (0,05 mM) e la cistamina (1 mM). Il livello di HSAox viene determinato a 412nm spettrofotometricamente (25°C).

Analisi Statistica

L'analisi statistica descrittiva al momento (dati in via di acquisizione) è stata focalizzata sulla sola popolazione di pazienti con IRC in terapia conservativa, calcolando la tendenza centrale e la variabilità. È stata eseguita per l'analisi inferenziale una ANOVA one-way per la valutazione degli effetti dell'integrazione, mentre una ANOVA a misure ripetute a uno o più fattori per la valutazione rispetto alla funzionalità renale. È stata eseguita la misura di significatività statistica "within" e "between"

Si considera statisticamente significativo il p-value < 0.05.

4. Risultati

La popolazione oggetto di studio, pazienti con CKD in terapia conservativa, ha mostrato tra le caratteristiche demografiche, un rapporto maschi/femmine di 14/6, tale rapporto riflette perfettamente il tasso di incidenza di CKD (**Tabella 1**). Le variazioni osservate nei parametri ematochimici probabilmente riflettono l'effetto dall'assunzione degli integratori in quanto il monitoraggio delle abitudini alimentari (PREDIMED) e dei livelli di attività fisica (IPAQ) al T0 e T3 non ha mostrato cambiamenti né di abitudini alimentari né di stile di vita (**Figura 3, Figura 4**).

Tabella 1: Caratteristiche demografiche della popolazione oggetto di studio.

Caratteristiche demografiche della popolazione oggetto di studio (n.20)	Valori osservati ± DS
Sesso (M/F)	14/6
Età (anni)	68,8±13,3
Peso (Kg)	71,55±9,2
Statura (m)	1,62±0,1
BMI (Kg/m ²)	27,53±4,6
Causa Nefropatia:	
a. Nefroangiosclerosi	10/20 (50%)
b. Nefropatia diabetica	3/20 (15%)
c. Patologia glomerulare	1/20 (5%)
d. Altre cause	6/20 (30%)
Diabete mellito (DMT2)	6/20 (30%)
Ipertensione arteriosa sistemica	12/20 (60%)

I valori sono espressi come media ± deviazione standard (DS).

Il chi quadro nonostante abbia mostrato significatività tra le proporzioni contiene dati prettamente soggettivi, inoltre è un test in grado di fornire una indicazione della forza con cui i dati contrastano l'ipotesi zero, ma non di fornire certezze (**Tabella 5, Tabella 6**).

A seguito della valutazione statistica dei parametri ematochimici (**Tabella 2**) sono state riscontrate delle significatività a livello di e-GST e HDL, in particolare i livelli di e-GST si è visto diminuiscono soprattutto quando si applica un trattamento con B (**Figura 5**), mentre i livelli di HDL aumentano rispetto all'integrazione generale. Per valutare l'effetto potenzialmente esercitato nei confronti della disfunzione renale, abbiamo suddiviso la popolazione in due sottogruppi (gruppo 1 con e-GFR <30 ml/min, gruppo 2 con e-GFR \geq 30 ml/min), dai quali sembrerebbe manifestarsi un effetto migliorativo sulla VES e sui livelli di HDL(**Tabella 3**):

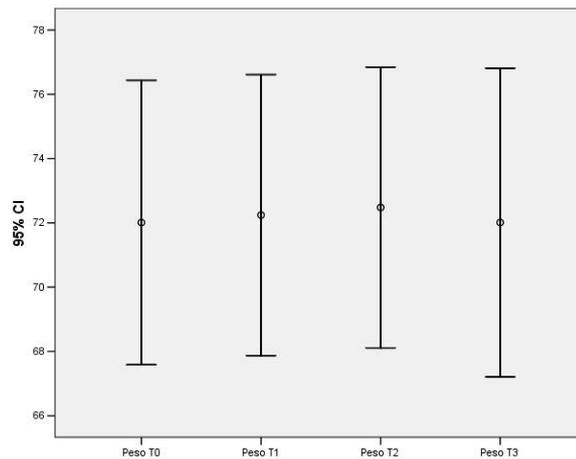


Figura 3: Andamento del Peso corporeo nei diversi intervalli di tempo (T0, T1, T2, T3)

Non si sono osservate variazioni significative nel peso corporeo.

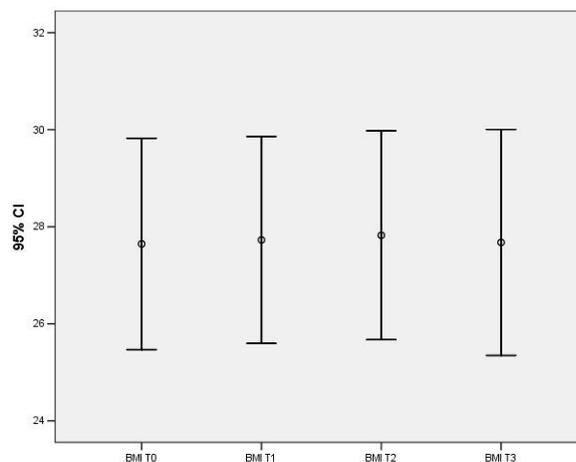


Figura 4: Andamento del BMI nei diversi intervalli di tempo (T0, T1, T2, T3)

Non si sono osservate variazioni significative in termini di BMI.

Tabella 2: Test chi-quadrato (PREDIMED).

Il test chi-quadrato dimostra proporzioni statisticamente significative ($p=0,017$) di PREDIMED dicotomico tra T0 e T3. Al T0 su 18 pz totali, 2 pz erano gruppo 1, 14 pazienti appartenevano al gruppo 2, e 2 pz al gruppo 3. Al T3 al gruppo 1 è rimasto 1 pz. Al gruppo 2 sono distribuiti 10 pz mentre al gruppo 3 sono afferiti 7 pz.

Tabella di contingenza di PREDIMED T0 e T3						
	Aderenza		PREDIMED T3			Total
			scarsa	media	buona	
PREDIMED T0	scarsa	Calcolo	1	1	0	2
		T0	50%	50%	0%	100%
		T3	100%	10%	0%	11,1%
	media	Calcolo	0	9	5	14
		T0	0%	64,3%	35,7%	100%
		T3	0%	90%	71,4%	77,8%
	buona	Calcolo	0	0	2	2
		T0	0%	0%	100%	100%
		T3	0%	0%	28,6%	11,1%
Totale	Calcolo	1	10	7	18	
	T0	5,6%	55,6%	38,9%	100%	
	T3	100%	100%	100%	100%	

Tabella 3: Test chi-quadrato (IPAQ).

Il test chi-quadrato dimostra proporzioni statisticamente significative ($p=0,001$) di IPAQ dicotomico tra T0 e T3. Al T0 su 18 pz totali, 6 pz appartenevano al gruppo 1, 9 al gruppo 2, e 3 al gruppo 3. Al T3 9 pz sono afferiti nel gruppo 1, 7 pz sono afferiti al gruppo 2, 2 pz al gruppo 3. Legenda: inattivo = minore 700 MET; sufficientemente attivo compreso tra 700-2519 MET; attivo o molto attivo superiore a 2520 MET.

Tabella di contingenza di IPAQ T0 e T3						
	Attività fisica		IPAQ T3			Totale
			inattivo	sufficiente	attivo	
IPAQ T0	inattivo	Calcolo	6	0	0	6
		T0	100%	0%	0%	100%
		T3	66,7%	0%	0%	33,3%
	sufficiente	Calcolo	3	6	0	9
		T0	33,3%	66,7%	0%	100%
		T3	33,3%	85,7%	0%	50,0%
	attivo	Calcolo	0	1	2	3
		T0	0%	33,3%	66,7%	100%
		T3	0%	14,3%	100%	16,7%
Totale	Calcolo	9	7	2	18	
	T0	50%	38,9%	11,1%	100%	
	T3	100%	100%	100%	100%	

Tabella 2: Parametri antropometrici ed ematochimici osservati a T0 e T3 rispetto al tipo di integrazione (B o S).

Parametri antropometrici analizzati rispetto al tipo di integrazione B o S (media±DS)					
Parametri	B		S		P
	T0	T3	T0	T3	
Peso T3-T0	70,5±8,7 0,24 ± 0,47	70,7±8,3	73,0±10,3 -0,51 ± 3,45	72,5±12,0	ns
BMI T3-T0	28,6±4,4 0,10 ± 0,19	28,7±4,3	26,4±4,8 -0,13 ± 1,11	26,3±5,5	ns
Pressione sistolica (mmHg) T3-T0	130,0±16,6 -2,11 ± 3,59	127,6±17,9	125,7±21,8 -1,29 ± 5,09	125,7±18,1	ns
Pressione diastolica (mmHg) T3-T0	75,2±7,8 -2,44 ± 11,30	73,1±8,3	73,9±12,0 0,00 ± 12,22	72,6±11,6	ns
Battiti per minuto (bpm) T3-T0	75,3±14,4 -4,67 ± 10,57	70,7±10,3	64,7±7,1 -1,71 ± 5,82	63,0±7,7	ns
Resistenza (Ohm) T3-T0	486,4±68,7 -11,50 ± 22,02	474,9±73,0	495,5±87,2 -9,67 ± 32,88	485,8±90,8	ns
Reattanza (Ohm) T3-T0	39,0±11,3 -1,20 ± 4,69	37,8±12,8	35,8±7,3 -1,00 ± 5,45	34,8±7,8	ns
PA (°) T3-T0	4,7±1,3 -0,10 ± 0,50	4,6±1,5	4,24±1,3 -0,04 ± 0,42	4,2±1,1	ns
BCMI T3-T0	8,8±2,3 0,00 ± 0,62	8,8±2,5	8,14±2,5 -0,04 ± 0,42	8,1±2,3	ns
Parametri ematochimici analizzati rispetto al tipo di integrazione B o S (media±DS)					
Parametri	B		S		P
	T0	T3	T0	T3	
Creatinina (mg/dl) T3-T0	3,3±1,9 -0,16 ± 0,27	3,1±1,8	1,9±0,8 -0,06 ± 0,18	1,9±0,8	ns
e-GFR (ml/min) T3-T0	24,3±13,5 1,63 ± 2,17	25,9±15,1	39,1±15,8 1,38 ± 5,69	40,5±16,3	ns
Glicemia (mg/dl) T3-T0	104,2±28,6 -0,89 ± 14,23	103,3±31,9	97,9±21,5 -7,56 ± 11,59	90,3±13,7	ns
Uricemia (mg/dl) T3-T0	6,4±0,6 -0,01 ± 0,66	6,4±1,0	6,7±1,2 -0,10 ± 0,42	6,6±1,2	ns
Azotemia (mg/dl) T3-T0	97,6±38,1 -7,33 ± 23,18	90,2±32,8	76,9±36,3 -8,78 ± 9,54	68,1±31,8	ns
Microalbum.(mg/g _{Cr})	440±581,4	568,4±783,4	153±308,9	137,8±262,9	

T3-T0	157,21 ± 230,75		-45,95 ± 69,64		ns
VES (mm/h) T3-T0	52,9±26,4 -4,90 ± 14,76	48,0±26,9	34,6±28,6 0,67 ± 10,60	35,2±27,3	ns
PCR (mg/L) T3-T0	11,8±23,2 -6,35 ± 13,26	5,5±10,0	8,7±15,5 -1,56 ± 4,50	5,2±11,1	ns
e-GST (U/g _{Hb}) T3-T0	13,6±4,5 -3,54 ± 4,14	10,4±2,6	11,9±4,3 0,05 ± 2,79	12,0±4,9	p=0,049
HSAox (µM) T3-T0	45,9±4,7 -1,31 ± 4,14	44,9±6,4	43,9±11,7 -1,03 ± 5,27	42,5±8,9	ns
PTH (pg/ml) T3-T0	99,0±48,7 18,93 ± 40,03	118,0±74,3	124,9±64,1 -6,33 ± 38,13	118,6±60,9	ns
Na (mEq/L) T3-T0	139,4±3,5 0,67 ± 2,65	140,1±3,2	141,3±2,1 -1,22 ± 3,67	140,1±2,7	ns
Ca (mg/dl) T3-T0	9,8±0,5 0,04 ± 0,43	9,8±0,7	9,3±0,7 0,11 ± 0,52	9,5±0,6	ns
K (mEq/L) T3-T0	4,7±0,6 0,12 ± 0,36	4,8±0,8	5,0±0,6 -0,19 ± 0,44	4,8±0,5	ns
P (mg/dl) T3-T0	3,8±0,7 0,17 ± 0,59	4,0±0,7	3,4±0,7 -0,09 ± 0,46	3,4±0,6	ns
Colesterolo tot. (mg/dl) T3-T0	191,6±63,3 -2,78 ± 10,92	188,8±62,9	165,1±45,6 -2,67 ± 18,73	162,4±44,2	ns
HDL (mg/dl) T3-T0	51,7±11,5 -1,89 ± 5,60	49,8±7,6	55,77±14,1 -3,67 ± 3,57	52,1±10,9	p=0,023
LDL (mg/dl) T3-T0	112,8±50,8 -14,00 ± 30,91	98,8±51,6	91,84±39,2 -2,44 ± 14,88	89,4±36,9	ns
Trigliceridi (mg/dl) T3-T0	123,1±66,9 27,67 ± 37,33	150,8±97,3	89,66±35,2 -1,56 ± 32,73	88,1±42,1	ns

I valori sono espressi come media ± deviazione standard (SD).

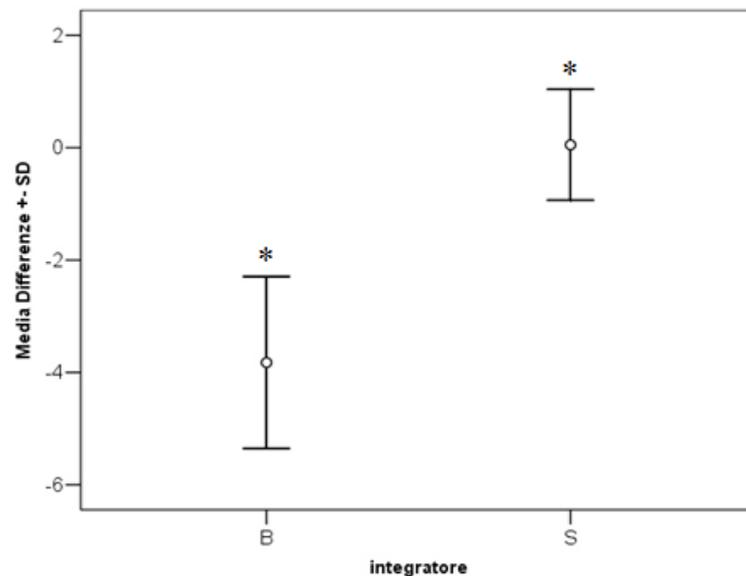


Figura 5: Effetto dell'integrazione di B ed S sui livelli ematici di e-GST. I risultati mostrati rappresentano la media delle differenze ±DS di 20 pazienti rispetto all'intervallo di tempo T3-T0.

*p=0,049.

Tabella 3: Parametri antropometrici ed ematochimici osservati a T0 e T3 rispetto al livello di funzionalità renale (e-GFR).

Parametri antropometrici analizzati rispetto a e-GFR					
Parametri	T0 eGFR 1	T0 eGFR 2	T3 eGFR 1	T3 eGFR 2	p
Peso	72,4±9,6	72,5±9,2	79,3±9,7	71,0±11	ns
BMI	27,9±3,9	27,3±5,2	28,0±3,8	27,2±5,6	ns
Pressione sistolica (mmHg)	133,3±14,1	124,1±21,2	131,6±10,2	123,0±21,3	ns
Pressione diastolica (mmHg)	77,1±7,4	72,7±10,9	75,6±7,5	70,8±10,8	ns
Battiti per minuto (bpm)	71,0±14,5	70,4±11,9	68,9±9,9	66,1±10,1	ns
Resistenza (Ohm)	484,4±77,0	493,4±99,5	474,4±83,9	479,6±83,7	ns
Reattanza (Ohm)	36,4±9,1	38,6±9,6	35,3±10,2	37,1±11,7	ns
PA (°)	4,3±0,7	4,6±1,3	4,2±0,8	4,5±1,5	ns
Parametri ematochimici analizzati rispetto a e-GFR					
Parametri	T0 eGFR 1	T0 eGFR 2	T3 eGFR 1	T3 eGFR 2	p
Creatinina (mg/dl)	4,0±1,6	1,7±0,5	3,9±1,5	1,6±0,4	ns
Glicemia (mg/dl)	96,7±10,3	103,8±30,9	90,7±5,2	100,7±31,4	ns
Uricemia (mg/dl)	6,4±0,6	6,7±1,2	6,4±1,0	6,5±1,3	ns
Azotemia (mg/dl)	108,9±42,8	73,5±27,8	102,7±35,9	64,2±21,9	ns
Microalbuminuria (mg/g _{cr})	385,2±301	278,5±595,9	377,1±281	368,0±804	ns
VES (mm/h)	55,1±23,9	38,6±31,0	61,4±23,8	31,3±23,6	p=0,029
PCR (mg/L)	14,7±27,8	6,7±14,0	7,1±11,8	4,6±10,8	ns
e-GST (U/g _{Hb})	11,9±2,4	13,4±5,5	11,2±1,8	11,3±4,9	ns
HSAox (μM)	50,3±5,5	41,3±8,9	48,3±6,3	39,9±6,0	ns
PTH (pg/ml)	106,1±87,4	114,6±33,4	121,5±88,5	118,4±56,3	ns
Na (mEq/L)	140,0±3,3	140,6±2,8	138,9±3,1	140,9±2,6	ns
Ca (mg/dl)	10,0±0,3	9,3±0,7	10,0±0,6	9,4±0,6	ns
K (mEq/L)	4,6±0,4	5,0±0,7	4,8±0,8	4,8±0,6	ns
P (mg/dl)	3,8±0,9	3,5±0,6	4,0±0,5	3,5±0,8	ns
Colesterolo tot. (mg/dl)	180,1±59,7	177,2±48,0	174,9±55,7	176,1±56,4	ns
HDL (mg/dl)	49,9±7,6	56,2±11,1	48,6±3,4	52,5±11,4	p=0,039
LDL (mg/dl)	102,6±48,4	102,2±40,0	97,4±41,9	92,0±46,9	ns
Trigliceridi (mg/dl)	120,6±70,6	97,4±51,9	121,0±89,3	118,5±77,2	ns

I valori sono espressi come media ± deviazione standard (SD).

5. Discussione e conclusioni.

I dati preliminari analizzati nel nostro studio hanno evidenziato che la somministrazione degli integratori da noi selezionati ha indotto un miglioramento dello stato di tossicità ematica nei pazienti nefropatici arruolati. Nello specifico si è osservato una riduzione dell'attività enzimatica della e-GST, che tende ad aumentare in correlazione allo stato di intossicazione dei pazienti. Inoltre, si è osservato un incremento statisticamente significativo dell'HDL-Colesterolo. Questo dato sembrerebbe essere notevolmente interessante in quanto, se confermato su una casistica più ampia, metterebbe in luce un potenziale effetto cardioprotettivo indotto dai due integratori. Tutto ciò è ulteriormente rafforzato in termini di beneficio indotto dai due integratori dal fatto che in tale popolazione di pazienti si osserva una mortalità cardiovascolare che è dalle 10 alle 20 volte maggiore rispetto a quella che si osserva nella popolazione generale. Bisogna, inoltre, considerare che per evitare le possibili interferenze notate nei parametri ematochimici e di composizione corporea analizzati indotti dall'assunzione degli integratori, abbiamo somministrato ai nostri pazienti all'inizio (T0) ed alla fine del tempo di osservazione (T3) il questionario PREDIMED ed IPAQ, mettendo in luce che nel corso dello studio i pazienti non hanno mutato le loro abitudini alimentari né lo stile di vita. L'ampliamento del campione e la valutazione dell'effetto dei due integratori sullo stato di salute nei soggetti sani sarà utile per confermare i risultati preliminari e valutare altri possibili effetti benefici indotti dai due integratori.

6. Bibliografia

- Bartolini D, Galli F. The functional interactome of GSTP: A regulatory biomolecular network at the interface with the Nrf2 adaptation response to oxidative stress. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016 Apr 15;1019:29-44.
- Bocedi A, Cattani G, Stella L, Massoud R, Ricci G. Thiol disulfide exchange reactions in human serum albumin: the apparent paradox of the redox transitions of Cys34. *FEBS J.* 2018 Sep;285(17):3225-3237.
- Bocedi A, Noce A, Fabrini R, Di Daniele N, Galli F, Ricci G. Erythrocyte Glutathione Transferase as a Biomarker in Kidney Health and Disease. *Biomarkers in Kidney Disease* (eds Patel VB, Preedy VR) Springer Science&Business Media Dordrecht. 2016;577-598.
- Bocedi A, Noce A, Rovella V, Marrone G, Cattani G, Iappelli M, Iaria G, Sforza D, Gallù Mariacarla, Tisone G, Di Daniele N, De Paolis P, Ricci G. Erythrocyte glutathione transferase in kidney transplantation: a probe for kidney detoxification efficiency. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 19;9(3):288.
- Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF, Oja P. International Physical Activity Questionnaire: 12-Country Reliability and Validity. *Med Sci Sports Exerc.* 2003 Aug;35(8):1381-95.
- D'Alessandro C, Piccoli GB, Calella P, Brunori G, Pasticci F, Egidi MF, Capizzi I, Bellizzi V, Cupisti A. "Dietaly": practical issues for the nutritional management of CKD patients in Italy. *BMC Nephrol.* 2016 Jul 29; 17(1):102.
- De Oliveira CM, Kubrusly M, Mota RS, Choukroun G, Neto JB, Da Silva CA. Adductor pollicis muscle thickness: a promising anthropometric parameter for patients with chronic renal failure. *J Ren Nutr.* 2012 May;22(3):307-16.
- Garlini LM, Alves FD, Ceretta LB, Perry IS, Souza GC, Clausell NO. Phase angle and mortality: a systematic review. *Eur J Clin Nutr.* 2018 Apr 26.
- Inker LA, Astor BC, Fox CH, Isakova T, Lash JP, Peralta CA, Kurella Tamura M, Feldman HI. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2014 May; 63(5):713-35.

- Levey AS, Becker BS, Inker LA. Glomerular Filtration Rate and Albuminuria for Detection and Staging of Acute and Chronic Kidney Disease in Adults: A Systematic Review. *JAMA*. 2015 February 24; 313(8):837-846.
- Levey AS, Stevens LA. Estimating GFR using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation: more accurate GFR estimates, lower CKD prevalence estimates, and better risk predictions. *Am J Kidney Dis*. Apr 2010;55(4):622-627.
- Martínez-Gonzales MA, García-Arellano A, Toledo E, Salas-Salvadó J, Buil-Cosiales P, Corella D, Covas MI, Schröder H, Arós F, Gómez-Gracia E, Fiol M, Ruiz-Gutiérrez V, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Muñoz MA, Wärnberg J, Ros E, Estruch R; PREDIMED Study Investigators. A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PLoS One*. 2012;7(8):e43134.
- Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One*. 2014 Jan 8;9(1):e85216.
- Noce A, Fabrini R, Bocedi A, Di Daniele N. Erythrocyte glutathione transferase in uremic diabetic patients: additional data. *Acta Diabetol*. 2015 Aug;52(4):813-5.
- Noce A, Fabrini R, Dessì M, Bocedi A, Santini S, Rovella V, Pastore A, Tesauro M, Bernardini S, Di Daniele N, Ricci G. Erythrocyte glutathione transferase activity: a possible early biomarker for blood toxicity in uremic diabetic patients. *Acta Diabetol*. 2014 Apr;51(2):219-24.
- Quintaliani G. Terapia nutrizionale nell'IRC in fase conservativa: suggerimenti di pratica clinica e di applicazione delle Linee Guida. *NephroMEET*. 2012. 00050.