

Effetti preventivi di una miscela di micronutrienti con proprietà anti-ossidative su sperimentazione di iperplasia prostatica indotta.

**** Torricelli P., Ferorelli P., Antonelli F. e Beninati S.**

Università di Roma, Tor Vergata, Dipartimento di Biologia, Italia,

** Dipartimento SPES, Università del Molise, Campobasso, Italia.

SOMMARIO

Una miscela di anti-ossidanti trovata in un integratore alimentare in commercio chiamato Citozym (CIZ), ha mostrato una capacità preventiva su iperplasie prostatiche indotte da testosterone propionato su topi C57BL6/N. I trattamenti con CIZ sono stati somministrati per via orale e hanno avuto inizio 10 giorni prima dell'induzione dell'iperplasia prostatica. Il TP aumentò di molto la grandezza della prostata ed i livelli di PSA sierico, e ciò mostrò come l'aumento fosse inibito in modo significativo nei topi CIZ-trattati comparandoli con controlli positivi dose dipendente. Concludiamo che CIZ può prevenire l'iperplasia prostatica indotta da TP e di seguito potrebbe essere di beneficio nella gestione di iperplasie prostatiche benigne.

INTRODUZIONE

L'iperplasia prostatica benigna (BPH) è una malattia correlata agli ormoni e all'età, caratterizzata da cambiamenti istologici e aumenti variabili della dimensione della prostata [1]. I fattori alimentari sicuramente giocano un ruolo nello sviluppo della BPH, come riscontrato nei dati epidemiologici i quali suggeriscono che l'incidenza di BPH in uomini Asiatici incrementi dopo aver adottato uno stile di vita occidentale [2]. Una dieta ricca di frutta e verdure può altresì ridurre l'avvenire di BPH. E' possibile ipotizzare che gli effetti benefici di sostanze alimentari e naturali con proprietà anti-ossidanti su rischi di cancro alla prostata, che sono stati osservati in studi epidemiologici, possono avvenire nei primi stadi pre-neoplastici della storia naturale della malattia [3,4]. Recentemente, gli anti-ossidanti naturali trovati in frutta, bevande (succhi, vino, the, cioccolato, etc.), ed in misura minore in verdure, verdure secche e cereali, è stato riportato che svolgano un ruolo nella prevenzione e/o nel trattamento di varie malattie associate allo stress ossidativo come il cancro, malattie cardiovascolari ed infiammazioni. Gli anti-ossidanti stanno riducendo agenti, come la vitamina C, la vitamina E e carotenoidi, che proteggono i tessuti corporei dagli effetti dello stress ossidativo [5]. La considerabile diversità delle loro strutture incide sulle loro proprietà biologiche: biodisponibilità, attività anti-ossidante e specifiche

interazioni con i recettori cellulari ed gli enzimi come il 5°-reduttasi, il quale catalizza la conversione del testosterone a diidrotestosterone , il quale è implicato come fattore causativo del BPH [6,7].Abbiamo recentemente riportato che una miscela di anti-ossidanti (CIZ) trovata in un integratore alimentare sul mercato abbia protetto topi C57BL6/n dal melanoma carcinogenesi, quando questi erano sottoposti a somministrazioni croniche prima delle fasi di iniziazione e promozione del melanoma [8] (Antonelli e Beninati, 2011).

L'obiettivo di questo studio era di investigare gli effetti preventivi del CIZ contro l'iperplasia prostatica indotta da TP in topi maschi C57BL6/n. Il CIZ è stato somministrato per via orale 10 giorni prima dell'induzione dell'iperplasia prostatica in topi C57BL6/N e durante i 30 giorni di induzione di questa patologia. Il peso corporeo e della prostata ed i livelli di PSA sierico dei topi sono state registrate durante l'esperimento in modo da determinare gli effetti dei trattamenti preventivi con CIZ sull'iperplasia prostatica indotta da TP.

Materiali e Metodi

Prodotti chimici

Il testosterone propionato è stato acquistato da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La miscela commerciale di anti-ossidanti (CIZ) è stata donata dalla Citozeatec (Citozeatec S.r.l Peschiera Borromeo, Milano, Italia). I componenti principali del CIZ sono i seguenti (unità/100g); 500 mg di vitamina C, 56 mg di vitamina B5, 56 mg di vitamina D, 3,3mg di vitamina B9, 222 mg di acido piruvico, 120 mg di acido citrico, 250 mg di acido tartarico e 77.8 g di carboidrato.

Induzione di iperplasia prostatica

BPH è stata indotta da iniezioni sub-cutanee di TP in dosi di 2 mg/giorno per topo, una volta al giorno per 30 giorni, dal Giorno 11 al Giorno 40. TP è stato sciolto in olio d'oliva (OO) ogni giorno prima della somministrazione agli animali.

Determinazione della concentrazione del siero testosterone.

I livelli individuali di testosterone di ogni animale di ogni gruppo sono stati misurati ogni 5 giorni usando un kit ELISA per il testosterone. L'effetto dei campioni di prova sui livelli di siero testosterone è stato misurato usando un lettore ELISA (Bioline BPR08). E' stato prelevato sangue dal plesso retro-orbitale dei topi e centrifugato a 2500 x g per 15 minuti. Il quantitativo di testosterone UBI Magiwel usato per il test è

basato su una fase solida immunoenzimatica competitiva. I campioni di prova competono con il testosterone enzima etichettato per un numero limitato e fissato di siti di anticorpi nei pozzi micropiastra. Nella procedura di prova, il siero testosterone standard o di prova è incubato con il testosterone anticorpo ed il perossido testosterone-rafano coniugato con pozzetti IgG anti-coniglio. In questo sistema a fase solida, il legame anticorpi testosterone rimarranno sul pozzo mentre il testosterone non legato sarà rimosso con un lavaggio. Un colore si sviluppa quando il substrato tetrametilbenzidina viene mischiato con il legame anticorpi e perossido testosterone-rafano enzimaticamente coniugato. Dopo una breve incubazione, la reazione enzimatica viene fermata e l'intensità del colore viene misurata con un microlettore a 450nm.

Determinazione dei livelli di antigene specifico del siero prostatico.

I livelli dell'antigene specifico prostatico (PSA) sono stati misurati per singolo topo di ogni gruppo per scoprire la gravità dell'iperplasia indotta nelle prostata mediante trattamento TP. Per questo scopo è stato utilizzato un kit ELISA PSA (Cusabio Biotech Co. Ltd, Newark, Delaware, USA). Il kit ELISA PSA è inteso per la determinazione del quantitativo totale di PSA. Il PSA è stato quantificato seguendo il metodo Nilsson et al. (1997). Il PSA ELISA è una fase solida, non immunologicamente competitiva basata sulla diretta tecnica sandwich. Calibratori, controlli e campioni sono stati incubati insieme con anticorpi anti-PSA monoclonali biotinilato ed anticorpi anti-PSA monoclonali perossido-rafano etichettato (HRP) in micropiastre rivestite di streptavidina. Dopo aver lavato, al substrato tamponato (TMB-HRP substrato) che contiene perossido di idrogeno è stato aggiunto il reagente cromogeno (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) ad ogni pozzo e alla reazione enzimatica è stato concesso di proseguire. L'intensità del colore è stata determinata dallo spettrofotometro delle micropiastre a 620 nm. Le curve di calibrazione sono state costruite per ogni saggio tracciando l'assorbanza verso la concentrazione di ogni calibratore. La concentrazione di PSA dei campioni è stata poi letta dalla curva del calibratore

Protocollo sperimentale

Topi maschi C57BL6/N (80) con 13 settimane di vita e un peso corporeo di circa 25/35 g sono stati divisi in quattro gruppi con 20 animali per gruppo. Il gruppo A ha ricevuto solo iniezioni sicutanee di OO per 30 giorni (controllo negativo). Il gruppo B è stato trattato con TP iniettato per via subcutanea per 30 giorni (controllo positivo). Il gruppo C è stato pretrattato con somministrazione per via orale di 5 ml/

giorno di CIZ, diluito con acqua fisiologica (PS) per 10 giorni 1:2 v/v e con CIZ (1:2 v/v) e TP per i successivi 30 giorni.

Il gruppo D è stato pretrattato con somministrazione per via orale di 5 ml/giorno di CIZ, diluito con PS per 10 giorni 1:4 v/v e con CIZ(1:4 v/v) e TP per i successivi 30 giorni. Queste dosi sono state scelte in base a precedenti studi su dose-risposta.

Brevemente, i trattamenti con CIZ sono iniziati 10 giorni prima dell'induzione dell'iperplasia prostatica attraverso TP e sono stati giornalieri. 24 ore dopo l'ultimo trattamento con CIZ e TP, i topi C57BL6/N sono stati sacrificati sotto anestesia e la prostata, la vescica and le vescicole seminali sono state rimosse. La prostata è stata attentamente sezionata lontana dalla vescica o dalle vescicole seminali, ed è stato determinato il peso fresco dell'intera prostata. Sono stati poi esaminati da procedure istologiche dei campioni di lobi prostatici.

Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite usando il test Mann-Whitney U per confronti tra i gruppi.

Il test di correlazione Spearman e le analisi di regressione lineare sono stati eseguiti per analizzare le correlazioni tra i gruppi B/C e B/D, la durata della somministrazione di CIZ e disegnare meno quadrati di linee di regressione. I valori sono stati espressi secondo la media \pm SD. $P < 0.05$ che è stata ritenuta statisticamente significativa.

Risultati

Effetto dei trattamenti con CIZ sul peso della prostata e sul rapporto peso/corpo della prostata peso dei topi C57BL6/N

Come mostrato nella tabella I, i pesi della prostata (PW) dei topi C57BL6/N dei quattro gruppi di trattamento evinti alla fine dello studio sono stati statisticamente differenti. Il PW dei topi del controllo negativo (gruppo A) è stato significativamente minore (50.6 ± 3.29 mg) rispetto al gruppo positivo (gruppo B) che ha ricevuto le iniezioni sub-cutanee di TP (84.9 ± 6.0 mg.). Il PW del gruppo C (48.5 ± 7.2 mg) è stato significativamente più basso rispetto al controllo positivo gruppo B e del gruppo D (74.2 ± 4.3 mg).

Il rapporto peso/corpo della prostata esprime come mg PW/100g di BW(PW/BW) di topi C57BL6/N per il controllo negativo (gruppo A) era significativamente minore (158.2 ± 12.8 mg PW/100 g di BW) rispetto al controllo positivo (gruppo B) che ha ricevuto iniezioni sub-cutanee di TP (303.2 ± 20.1 mg PW/100 g di BW). Il PW/BW del gruppo C che ha ricevuto un pretrattamento per via orale di CIZ diluito 1:2 e di

iniezioni sub-cutanee di TP sono stati significativamente più bassi (134.7 ± 11.0 mg PW/100 g di BW) rispetto al controllo positivo gruppo B. Nessuna differenza statistica è stata rilevata tra il PW/BW del gruppo D (296.8 ± 23.5 mg PW/100 g di BW) che ha ricevuto un pretrattamento per via orale di CIZ diluito 1:4 e di iniezioni sub-cutanee di TP ed il controllo positivo gruppo B.

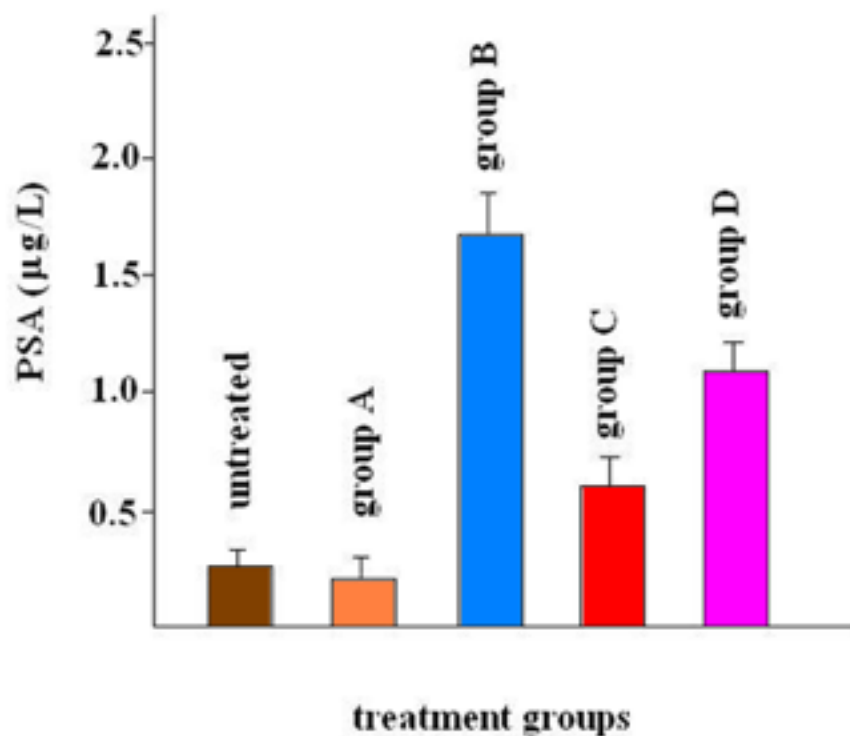
TAVOLA I
EFFECTS OF CIZ TREATMENTS ON PROSTATE WEIGHT (PW) AND
PROSTATE WEIGHT/BODY WEIGHT RATIO (PW/BW) OF C57BL6/N
MICE

| Treatment group (mg) | PWPW/BW (mg PW/100 g of BW) | |
|------------------------------|--------------------------------|-------------|
| A (negative control) 12.8 | 50.6 ± 3.2 | $158.2 \pm$ |
| B (positive control) 20.1 | 84.9 ± 6.0 | $303.2 \pm$ |
| C (CIZ 1:2/TP) 11.0 | 48.5 ± 7.2 | $134.7 \pm$ |

Effetti dei trattamenti con CIZ sui livelli di PSA sierico dei topi C57BL6/N

I livelli di siero PSA sono anormalmente alti in pazienti con cancro alla prostata, ipertrofia prostatica benigna (BPH) e in pazienti con condizioni infiammatorie alla prostata (Catalona et al., 1995). L'effetto della somministrazione di TP sui livelli di PSA dei topi C57BL6/N è una indicazione dell'ipertrofia della prostata indotta da TP. Questo parametro è stato misurato nel siero degli animali campione di vari gruppi usando il PSA ELISA kit seguendo la procedura fornita dal kit. Come mostrato nella Fig. 1, il livello normale di PSA nei topi trattati dal veicolo (OO) (gruppo A) è stato trovato essere 0.227 ± 0.094 µg/L. Il livello di PSA è salito a 1.690 ± 0.522 µg/L negli animali trattati con TP (gruppo B). I topi trattati con CIZ, gruppo C e D, hanno mostrato una diminuzione dei livelli di PSA a rispettivamente 0.617 ± 0.132 µg/L ed 1.136 ± 0.324 ($p < 0.05$), paragonati al gruppo B trattato con TP. I topi non trattati hanno mostrato livelli di PSA di 0.257 ± 0.123 ($p < 0.01$). Queste osservazioni indicano gli effetti preventivi del CIZ su iperplasia indotta da TP.

FIGURA 1



Discussione

BPH è un problema di salute comune e coinvolge i cambiamenti ormonali nella crescita dell'uomo [9] (Bhargava et al. 2004). Lo sviluppo e la crescita della ghiandola prostatica dipende dalla stimolazione degli androgeni, principalmente dal diidrotestosterone (DHT), che si forma nella prostata, come per altri tessuti, attraverso la conversione enzimatica del testosterone nel suo metabolita più attivo DHT, catalizzato dal *5 α -reduttasi* prostatico. DHT lega ai recettori androgenici e promuove la sintesi proteica e la crescita cellulare. I radicali liberi e le specie ossigeno reattive (ROS) vengono prodotte di più con l'avanzare dell'età e questo porta allo stress ossidativo [0] (Aryal M et al. 2007). In situazione di stress ossidativo queste specie reattive causano un danno estensivo a vari organi del corpo, ciò può essere associato inoltre alla patogenesi di BPH.

Poiché riproduce adeguatamente le caratteristiche maggiori del BPH umano, includendo i cambiamenti funzionali ed istologici, l'allargamento prostatico indotto da testosterone è stato utilizzato per valutare gli effetti di trattamenti potenziali per BPH [11] (Noa et al. 2005). Questo studio ha investigato sulla possibilità che il dosaggio per via orale di una miscela di anti-ossidanti, reperibile sul mercato, composta da vitamina C, D e B e acidi citrici e tartarici con altri componenti potesse prevenire BPH indotto da TP nei topi. Considerando le prove pubblicate, gli effetti

del CIZ trovati qui sono consistenti alla presenza dei componenti citati. Altresì, la crescita della mole di prove supporta la nozione per la quale la vitamina C sia negativamente implicata nella patogenesi di BPH. Per esempio, degli studi caso-controllo hanno dimostrato che gli uomini che consumano frutta e verdure ricchi di vitamina C hanno una minore incidenza di BPH [13]. Infatti, le concentrazioni plasmatiche di vitamina C sono state trovate significativamente minori in pazienti affetti da BPH rispetto a quelli dei normali controlli di salute [14]. In accordo con ciò, studi clinici suggeriscono che la vitamina C abbassi il rischio di sviluppo di BPH, e poiché la vitamina C normalmente agisca alla riduzione di stress ossidativo, potremmo aspettarci che influisca sullo sviluppo di BPH. Un crescente numero di prove suggerisce che gli effetti biologici della vitamina C sono dovuti al suo specifico al suo specifico target di segnalazione cellulare e ai sistemi di regolazione genetica. Inoltre, la vitamina C è conosciuta per reprimere vari fattori di trascrizione, come l'IRF e l'NF- κ B, e per la soppressione dei loro geni downstream, [15-17]. In aggiunta, l'inibizione HIF-1 α della vitamina C è stato rivalutato poiché la vitamina C inizia la degradazione di HIF-1 α attivando PHDs. In particolare, uno studio xenografico su tumore ha dimostrato che la vitamina C ha un'attività anti-cancro *in vivo* avendo come mira HIF-1 α [18], e altri studi hanno inoltre mostrato che la vitamina C possiede effetti inibitori di HIF-1 α in varie cellule tumorali [19]. L'insufficienza di vitamina D è stata suggerita essere un fattore di rischio per il cancro alla prostata [20] Ahonen (et al) [21] ha riportato che il rischio di cancro alla prostata, analizzato per quartili dei 25 livelli di (OH)D₃, era inversamente relazionata ai 25 livelli di D (OH). In aggiunta, un basso livello di vitamina D era associato ad una maggiore probabilità di avere diagnosticato il cancro alla prostata ad un'età minore ed a un maggiore stato di avanzamento [21]. Recentemente, Tretli et al [22] ha suggerito il livello sieroso della vitamina D aveva un significato pronostico per i pazienti con il cancro prostatico.

Il citrato, uno dei componenti del ciclo di Krebs, è stato riportato come elevatore della solubilità di metalli pesanti legando agli ioni di questi, e legando con lo zinco potrebbe aumentarne la biodisponibilità [23]. In aggiunta, simile allo zinco, il citrato è accumulato in cellule prostatiche normali a concentrazione elevate, e queste sono state trovate essere rilevantemente minori in cellule prostatiche tumorali [24]. L'epitelio secretorio della prostata ha la capacità di accumulare e secernere livelli straordinariamente elevati di citrato. Ma il livello di citrato è significativamente minore in situazioni cancro alla prostata. Quindi, il citrato mostra caratteristiche simili allo zinco in prostate normali e tumorali. Conseguentemente a queste caratteristiche che aiuterebbero nella prevenzione e nel trattamento del cancro alla prostata, l'interesse per il citrato sta crescendo. Un metodo [25] (Lebioda L and Jakob CG. USA patent n. 5,763,490, 1998) è stato comunicato per il trattamento del cancro

alla prostata con la somministrazione di ioni tartarici da un derivato del tartrato. Una importante caratteristica dell'invenzione è l'uso di ioni tartarici L come inibitori di acidi fosfati prostatici (PAP). L'inibitore legherà prontamente con la regione di PAP e così prevenire la stessa azione di altri ioni o componenti.

Sebbene gli effetti dei trattamenti sull'acquisto di PW siano evidenti, dovrebbero teoricamente essere relativi ai cambiamenti di BW, il rapporto PW/BW è pertanto stato usato come il principale metro di giudizio sugli effetti del trattamento su questo modello. Poiché in questo studio i trattamenti non hanno influito significativamente su BW, gli effetti sul rapporto PW/BW possono essere attribuiti ad effetti sul acquisto di PW. In che modo siano promettenti o clinicamente rilevanti gli effetti del CIZ riportati qui rimane da scoprire. Questi risultati necessitano di essere riprodotti, e dovranno essere testati più alti dosaggi e più lunghi trattamenti, e inoltre in modelli differenti per determinare se sia giusto accreditare tali effetti in uomini con BPH.

Riconoscimenti

Sinceri ringraziamenti vanno al Dr. Ferorelli per la discussione critica ed il rilascio del permesso per adempire agli studi *in vivo*. Sono dovuti i ringraziamenti al Dr. Rudolf Pielokovich(Dipartimento di Farmaco-Biologia, College of Pharmacy, Vienna, Austria,) per il suo aiuto durante gli studi *in vivo*.

Conflitti di interesse

Gli autori non hanno potenziali conflitti di interessi

Referenze

1. G. Bergers, D. Hanahan Nat Rev Cancer, 8 (2008), pp. 592–603
2. H.E. Ryan, M. Poloni, W. McNulty, D. Elson, M. Gassmann, J.M. Arbeit *et al.* Cancer Res, 60 (2000), pp. 4010-4015
3. P. Jaakkola, D.R. Mole, Y.M. Tian, M.I. Wilson, J. Gielbert, S.J. Gaskell *et al.* Science, 292 (2001), pp. 468- 472
4. R.K. Bruick, S.L. McKnight Science, 294 (2001), pp. 1337-1340
5. N. Masson, C. Willam, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe EMBO J, 20 (2001), pp. 5197-5206

6. A.C. Epstein, J.M. Gleadle, L.A. McNeill, K.S. Hewitson, J. O'Rourke, D.R. Mole *et al.* *Cell*, 107 (2001), pp. 43-54
7. R.J. Appelhoff, Y.M. Tian, R.R. Raval, H. Turley, A.L. Harris, C.W. Pugh *et al.* *J BiolChem*, 279 (2004), pp. 38458-38465
8. F. Antonelli and S. Beninati *Res. Sign. Trivandrum Life Sciences*, 15 (2012), pp. 2675-2686
9. H. Zhong, K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, C. Hanrahan, M.M. Georgescu *et al.* *Cancer Res*, 60 (2000), pp. 1541-1545
10. B.H. Jiang, G. Jiang, J.Z. Zheng, Z. Lu, T. Hunter, P.K. Vogt *Cell Growth Differ*, 12 (2001), pp. 363-369
11. N.J. Mabweesh, M.T. Willard, C.E. Frederickson, H. Zhong, J.W. Simons *Clin Cancer Res*, 9 (2003), pp. 2416-2425
12. S.H. Rudolphsson, A. Bergh *J Endocrinol*, 196 (2008), pp. 11-19
13. H. Araki, H. Watanabe, T. Mishina, M. Nakao *Prostate*, 4 (1983), pp. 253-264
14. P. Lagiou, J. Wu, A. Trichopoulou, C.C. Hsieh, H.O. Adami, D. Trichopoulos *Urology*, 54 (1999), pp. 284-290
15. M. Aryal, A. Pandeya, N. Gautam, N. Baral, M. Lamsal, S. Majhi *et al.* *Nepal Med Coll J*, 9 (2007), pp. 222-224
16. Y.S. Chun, E.J. Yeo, E. Choi, C.M. Teng, J.M. Bae, M.S. Kim *et al.* *BiochemPharmacol*, 61 (2001), pp. 947-954
17. S.E. Park, J.W. Park, Y.S. Cho, J.H. Ryu, J.S. Paick, Y.S. Chun *Prostate*, 67 (2007), pp. 1514-1523
18. F. Wu, K. Tyml, J.X. Wilson *FEBS Lett*, 520 (2002), pp. 122-126
19. T. Cindrova-Davies, O. Spasic-Boskovic, E. Jauniaux, D.S. Charnock-Jones, G.J. Burton *Am J Pathol*, 170 (2007), pp. 1511-1520
20. A.G. Bowie, L.A. O'Neill *J Immunol*, 165 (2000), pp. 7180-7188
21. P. Gao, H. Zhang, R. Dinavahi, F. Li, Y. Xiang, V. Raman *et al.* *Cancer Cell*, 12 (2007), pp. 230-238
22. K.J. Nytko, P. Spielmann, G. Camenisch, R.H. Wenger, D.P. Stiehl *Antioxid Redox Signal*, 9 (2007), pp. 1329-1338

23. M.C. Vissers, S.P. Gunningham, M.J. Morrison, G.U. Dachs, M.J. Currie *Free Radic Biol Med*, 42 (2007), pp. 765-772
24. J.A. Rodríguez, B. Nespereira, M. Pérez-Ilzarbe, E. Eguinoa, J.A. Páramo *Cardiovasc Res*, 65 (2005), pp. 665-673
25. Lebioda L and Jakob CG. Treating prostate cancer with tartrate ions USA patent n. 5,763,490, 1998