

**NUOVA
FORMULA**

REUMA COLLAGEN®

integratore alimentare



“La composizione di REUMACOLLAGEN® è stata studiata in collaborazione con il Dipartimento di Farmacia dell’ Università degli Studi di Napoli Federico II”

REUMACOLLAGEN® è un integratore alimentare a base di collagene idrolizzato e vitamina C che contribuisce alla normale formazione del collagene per la normale funzione delle cartilagini e delle ossa. Ashwagandha (*Withania somnifera*) ha azione tonica-adattogena, è utilizzata per contrastare stanchezza fisica e mentale, per sostenere le naturali difese dell'organismo ed è utile per promuovere il rilassamento ed il benessere mentale.

INGREDIENTI:

FORTIGEL® (collagene idrolizzato bovino; "FORTIGEL® is a trademark of GELITA AG"), Vitamina C (acido L-ascorbico), Maltodestrine, Aroma arancia rossa, Estratto secco di *Vitis vinifera* L.-frutto, Ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal) estratto secco di radice titolato al 5 % in Withanolidi; Agente antiagglomerante: Silice biossido; Coadiuvante tecnologico: Beenato di glicerolo; Edulcorante: Sucralosio.

CONTENUTI MEDI	PER DOSE GIORNALIERA (1 bustina)
FORTIGEL® (collagene idrolizzato bovino)	5 g
VITAMINA C (acido L-ascorbico)	1 g (1250% VNR*)
Estratto secco di <i>Vitis vinifera</i> L.-frutto	400 mg
ASHWAGANDHA (<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal) estratto secco di radice	250 mg
Titolato al 5% in Withanolidi	12,5 mg

(*VNR= Valori Nutritivi di Riferimento)

MODO D'USO: si consiglia l'assunzione di 1 bustina al giorno

CONTENUTO: 30 bustine da 8 g Peso: 240 g

AVVERTENZE: Non superare la dose giornaliera consigliata. Gli integratori non vanno intesi come sostituti di una dieta variata e di uno stile di vita sano. Tenere fuori dalla portata dei bambini. Conservare in luogo fresco ed asciutto.

Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina. Nutrizione e farmacia.

Vietata la diffusione al pubblico.

Nell'ambito della Convenzione di Ricerca, stipulata fra il **Dipartimento di Farmacia - Università degli Studi di Napoli Federico II** e **GE.FO. NUTRITION s.r.l.**, è stata valutata, in un sistema modello in vitro, l'influenza di alcuni componenti ammessi negli integratori alimentari sulla formazione intra- ed extracellulare di collagene, glicoproteina strutturale abbondantemente presente nelle cartilagini.

L'artrite (o artrite reumatoide) è una malattia cronica e autoimmune che si manifesta attraverso infiammazioni croniche delle articolazioni. La sua insorgenza interessa circa il 2% della popolazione, non è strettamente correlata con l'età ed è più comune nelle donne che negli uomini. L'attuale trattamento di questa patologia degenerativa a carico delle articolazioni comprende tre categorie di farmaci: antinfiammatori non steroidei (FANS), glucocorticoidi come dexametasone e farmaci antireumatici (Peng-Thim e Keng-Hong, 2007).

L'artrosi è una patologia dovuta all'invecchiamento naturale dei tessuti connettivi. Essa è accompagnata dall'insorgenza di dolori ed è correlata con l'interruzione dell'integrità strutturale della cartilagine, il cui deterioramento ed eventuale perdita di elasticità sono il risultato di uno squilibrio anabolico e catabolico del tessuto cartilagineo, con un'alterazione della composizione della matrice che comporta una progressiva diminuzione di collagene di tipo II nella matrice cartilaginea (Koepp H, et al, 1999; Buckwalter JA et al., 2000).

L'approccio terapeutico consiste nell'assunzione di farmaci (farmaci analgesici, farmaci antiinfiammatori non steroidei, inibitori selettivi della ciclossigenasi-2, farmaci condroprotettori quali l'acido ialuronico, utilizzato per via intraarticolare), combinata con la modifica dello stile di vita (regime dietetico che porti a una perdita di peso (qualora il soggetto sia in sovrappeso o obeso) e con l'assunzione di integratori alimentari a base di glucosamina, condroitin-solfato, diacerina, S-adenosil-metionina). Quando la terapia farmacologica non è più efficace si può arrivare al trattamento chirurgico con l'impianto di protesi all'anca e al ginocchio. I processi infiammatori delle articolazioni e dei tessuti circostanti determinano dolori articolari e deformità, fino alla progressiva distruzione della cartilagine e dell'osso (Feldmann et al., 1996). Poiché l'uso a lungo termine degli agenti farmacologici impiegati nel trattamento di artrite e artrosi provoca effetti collaterali gravi (Weisman, 2005), soprattutto nelle fasi iniziali della malattia è stato proposto l'impiego di alcuni estratti vegetali per alleviare il dolore, che è un sintomo regolare di questa malattia.

Inoltre, studi preclinici hanno dimostrato che la somministrazione di collagene idrolizzato stimola la rigenerazione del tessuto collagenico, aumentando non solo la sintesi del collagene, ma anche la sintesi di componenti minori (glicosaminoglicani e acido ialuronico) e aiutando a ridurre e prevenire dolori articolari, perdita di densità ossea e l'invecchiamento cutaneo (Teresa Figueres Juher et al. 2015).

**Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina.
Nutrizione e farmacia.**

Vietata la diffusione al pubblico.



Numerosi composti ed estratti vegetali ammessi quali ingredienti degli integratori alimentari sono stati testati su un modello sperimentale *in vitro* costituito da fibroblasti isolati da liquido sinoviale (SW 982 - Synovial Sarcoma Human - ATCC). (I fibroblasti sono cellule del tessuto connettivo in grado di produrre le componenti della matrice extracellulare). Il modello cellulare è stato sottoposto ad attivazione mediante LPS (lipopolisaccaride isolato dalla parete batterica di *E.coli*) comunemente impiegato per la simulazione *in vitro* di un processo infiammatorio (Adam Mor et al, 2005) (Fig.1)

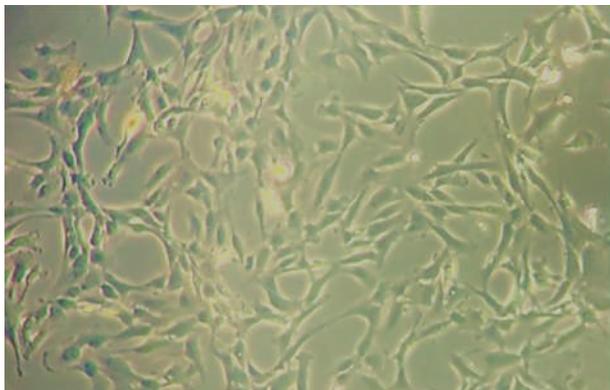


Fig.1 Modello Sperimentale utilizzato (SW 982 - Synovial Sarcoma Human)

Lo svolgimento dello studio, secondo la Convenzione stipulata, prevedeva lo screening di numerosi composti ed estratti vegetali per la valutazione della formazione di collagene extracellulare e intracellulare mediante un saggio colorimetrico nel sistema modello sopra descritto. Prima di effettuare gli esperimenti è stato necessario effettuare prove di solubilità e di citotossicità. Le prove di solubilità sono state eseguite in acqua, in DMSO (dimetilsofossido) ed etanolo a partire da concentrazioni di 1 mg/mL fino a 10 mg/mL. Nell'ottica della preparazione di un integratore alimentare, sono stati esclusi dai saggi sul modello cellulare, i componenti scarsamente solubili in acqua e i componenti solubili solo in DMSO ed etanolo.

I componenti solubili in acqua sono stati sottoposti ad uno screening iniziale mediante **saggio di citotossicità MTT** o 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Mosmann et al., 1986) per testarne gli effetti sulla proliferazione e l'eventuale tossicità sul modello sperimentale cellulare prescelto.

Le cellule sono state coltivate in multiwells da 96 pozzetti a una confluenza di circa l'80% e sottoposte al trattamento con i componenti in esame per 24 ore, tempistica sufficiente a fornire informazioni complete sul ciclo di replicazione cellulare. La reazione colorimetrica determinata dall'MTT permette, in seguito alla lettura spettrofotometrica, di valutare i valori di assorbanza che sono direttamente proporzionali alla vitalità cellulare.

Lo studio della bibliografia corrente e le precedenti prove di solubilità hanno permesso di individuare le concentrazioni da cui partire per effettuare lo screening di citotossicità dei componenti in esame. Lo screening è stato effettuato in un range di concentrazioni comprese fra 0,125 e 5 mg/mL (0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 mg/mL).

**Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina.
Nutrizione e farmacia.**

Vietata la diffusione al pubblico.

Per semplicità verranno di seguito riportati solo i componenti che alla fine degli studi sono stati prescelti per la realizzazione dell'integratore:

- **Ashwagandha:** il nome botanico è *Whitania somnifera* ed è stata oggetto di numerosissimi studi scientifici per le sue proprietà benefiche tra cui la modulazione dei processi infiammatori (Dar NJ et al. 2015); ha azione tonica-adattogena, è utilizzata per contrastare stanchezza fisica e mentale, per sostenere le naturali difese dell'organismo ed è utile per promuovere il rilassamento ed il benessere mentale. (Ramakanth GSH et al.2016; Chengappa et al. 2013; Nawab et al. 2015)
- **Taurisolo® : Estratto secco di *Vitis vinifera* L.-frutto**, frutto ottenuto dal noto vitigno a bacca rossa Aglianico, ricco in resveratrolo e catechine, risultato utile nella riduzione dei livelli sierici di TMAO (trimetilammina-N-ossido, proinfiammatorio) negli esseri umani (Annunziata G et al., 2019).
- **Collagene idrolizzato bovino FORTIGEL®** a base di Peptidi Bioattivi. Il collagene rappresenta circa il 30% delle proteine corporee totali: è fondamentale per articolazioni, ossa, muscoli, legamenti, tendini, pelle, capelli, unghie. È una delle proteine strutturali primarie dei tessuti connettivi e anche abbondante nei vasi sanguigni, nei dischi intervertebrali, nella barriera emato-encefalica, nella cornea, nella dentina e nella parete intestinale. I Peptidi Bioattivi derivano da un processo di produzione altamente controllato: gli enzimi (endopeptidasi) tagliano il collagene idrolizzato in punti specifici; i corti peptidi così formati presentano due caratteristiche uniche: una struttura a "punta di elica" molto compatta che ne permette l'assorbimento a livello intestinale attraverso il trasporto paracellulare e il riconoscimento da parte dei recettori (integrine) delle cellule preposte alla produzione del collagene (condrociti) che vengono così stimolate a produrre nuovo collagene. (Mienaltowski et al. 2014)

Le cellule trattate con Ashwagandha hanno mostrato che essa influisce sulla proliferazione cellulare con un'inibizione di circa il 75% a partire da 2 mg/mL (Fig.2).

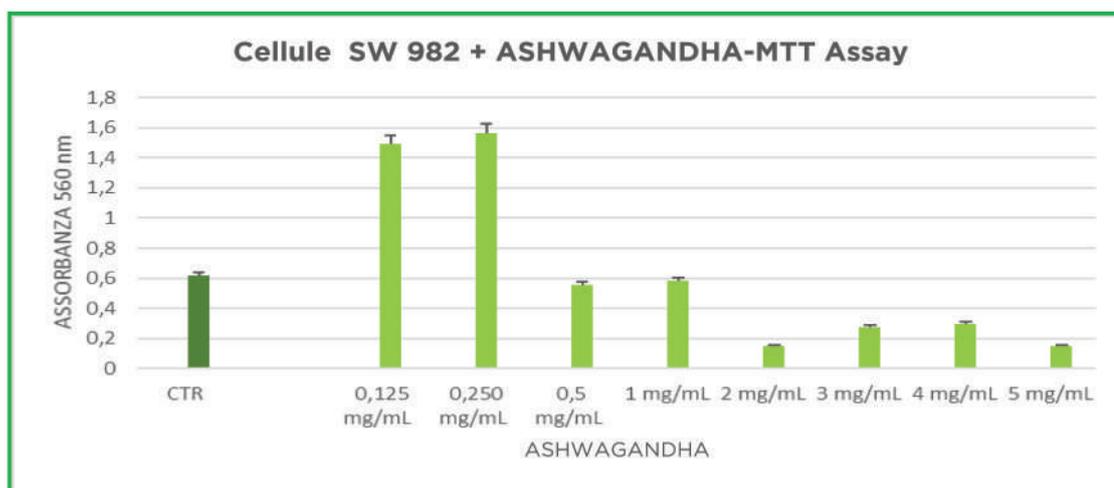


Fig. 2 MTT con Ashwagandha.

(Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato).

**Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina.
Nutrizione e farmacia.
Vietata la diffusione al pubblico.**

Le cellule trattate con Taurisolo® subiscono una riduzione della proliferazione di circa il 35% a partire da 3 mg/mL (Fig. 3).

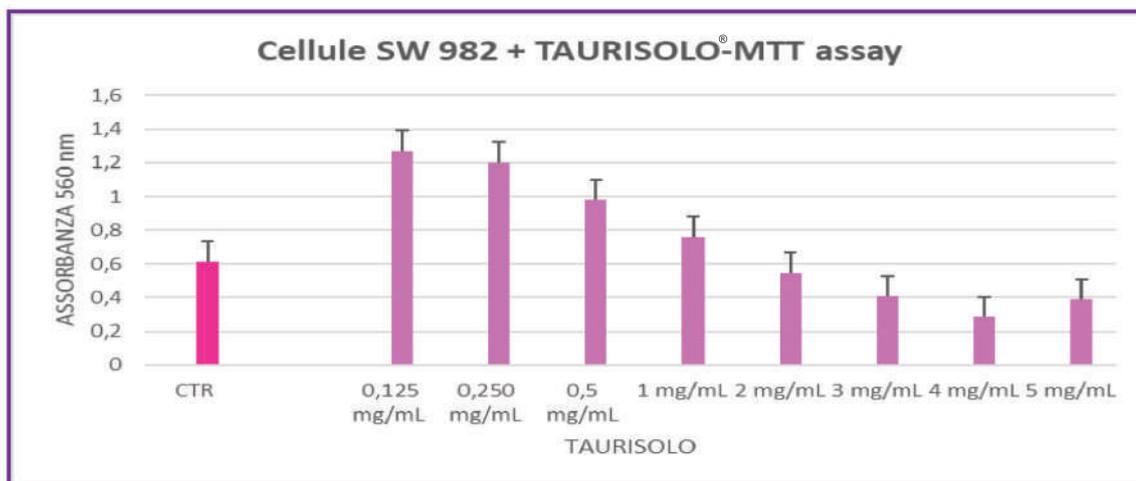


Fig. 3 MTT con Taurisolo®

(Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato).

Il Collagene Bovino non risulta tossico per le cellule utilizzate come modello sperimentale (Fig.4).

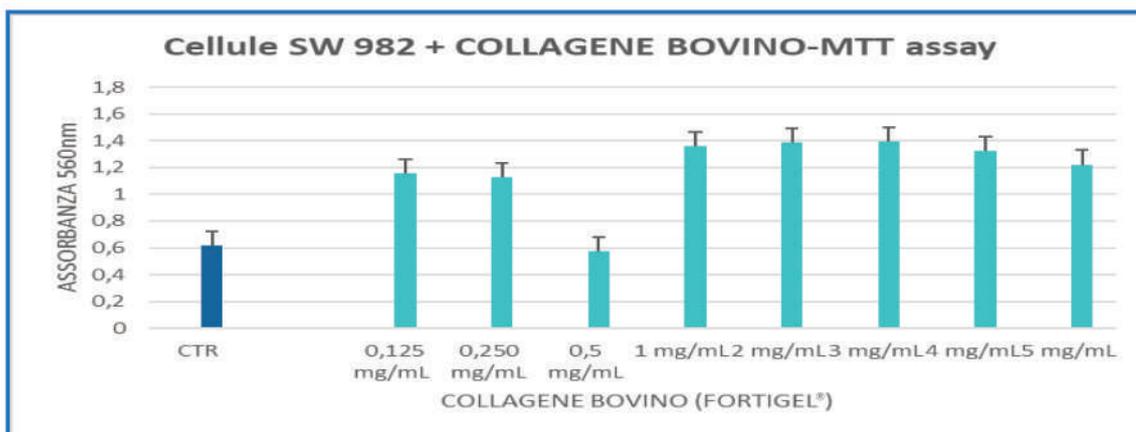


Fig. 4 MTT con Collagene Bovino.

(Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato).

**Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina.
Nutrizione e farmacia.
Vietata la diffusione al pubblico.**

In base alle prove di solubilità iniziali, alle concentrazioni testate e ai risultati ottenuti con il saggio di citotossicità (Tabella 1) si è scelto di effettuare i dosaggi di Collagene extracellulare (secreto dalle cellule) e del Collagene intracellulare (sintetizzato all'interno delle cellule) ad una concentrazione di 1 mg/mL.

componenti mg/mL	ASHWAGANDHA	TAURISOLO®	COLLAGENE FORTIGEL®
0,125	NC	NC	NC
0,250	NC	NC	NC
0,5	NC	NC	NC
1	NC	NC	NC
2	CT	CT	NC
3	CT	CT	NC
4	CT	CT	NC
5	CT	CT	NC

Tabella 1: Concentrazioni non citotossiche (NC) e concentrazioni citotossiche (CT) per ogni componente.

Per effettuare i dosaggi del collagene le cellule sono state piastrate in multiwells da 12 pozzetti. Le cellule sono state prima attivate con LPS per 4 ore, in modo da ottenere un modello cellulare attivato e poi trattate con i singoli componenti prescelti. L'esperimento è stato condotto in parallelo con cellule di controllo trattate con i singoli componenti ma non attivate con LPS. Dopo 24 ore di incubazione tutte le cellule e tutti i surnatanti (mezzo di coltura liquido in cui le cellule hanno eventualmente secreto il collagene) sono stati raccolti. Seguendo il protocollo fornito dal kit di dosaggio del collagene (Sircol- Soluble Collagen Assay) è stato dosato il collagene rilasciato all'esterno e il collagene interno facendo riferimento ad una curva standard di collagene fornita dal kit in un range di concentrazione da 5 a 45 µg/mL (Fig.5). Secondo le indicazioni fornite, il kit fornisce informazioni quantitative sul collagene neoformato.

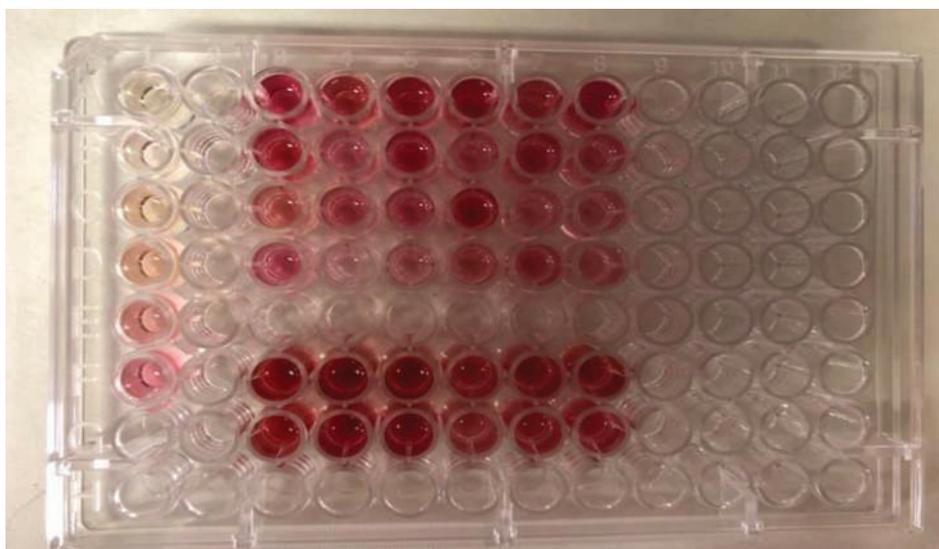


Fig.5 Dosaggio quantitativo di collagene in surnatanti raccolti da cellule trattate con i componenti.

**Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina.
Nutrizione e farmacia.**

Vietata la diffusione al pubblico.

In seguito a lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 555 nm, i valori in $\mu\text{g}/\text{mL}$ di collagene sono stati ottenuti mediante estrapolazione dalla curva standard (colonna 1 della Fig.6).

A. DOSAGGIO DI COLLAGENE EXTRACELLULARE.

I risultati hanno dimostrato che la concentrazione di collagene dosato nel sistema modello costituito dalle cellule di controllo attivate con LPS è $75,2 \mu\text{g}/\text{mL}$. Le cellule attivate e trattate separatamente con l'Ashwagandha ($1 \text{ mg}/\text{mL}$) e il Taurisolo[®] ($1 \text{ mg}/\text{mL}$) producono rispettivamente $183 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $162 \mu\text{g}/\text{mL}$ di collagene (Fig.6B), mentre il solo collagene non induce un incremento statisticamente significativo rispetto alle cellule di controllo sia attivate sia non attivate con LPS (Fig.6A e Fig.6B).

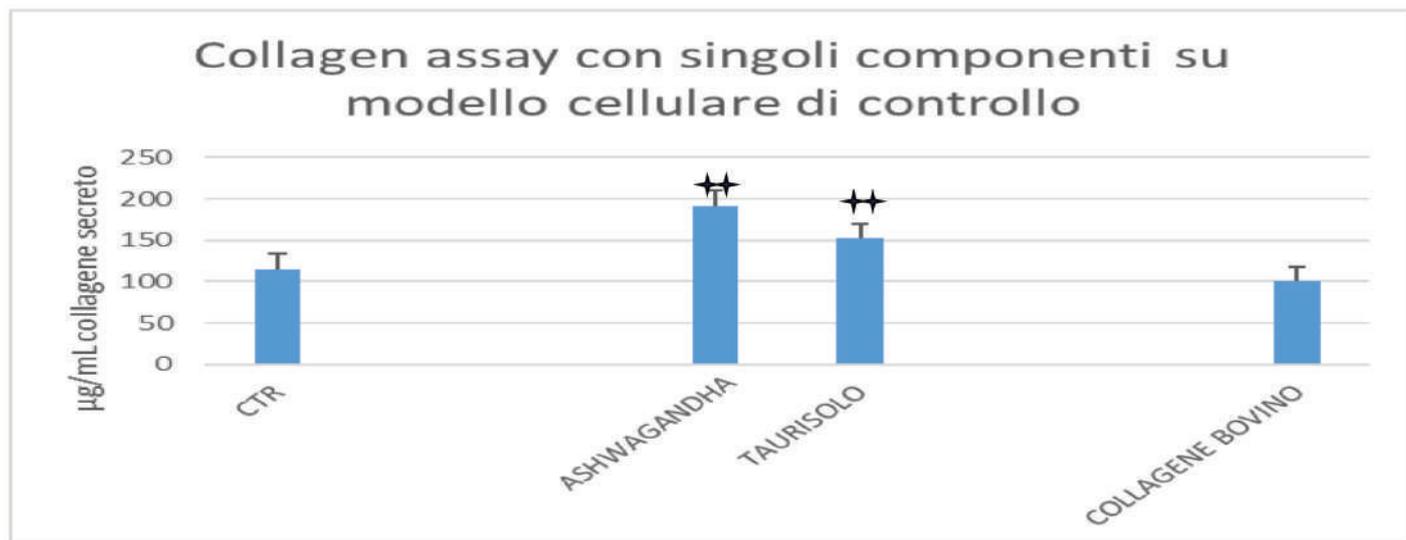


Fig 6A. Dosaggio del Collagene extracellulare secreto dal modello cellulare controllo in seguito al trattamento con i singoli componenti prescelti.

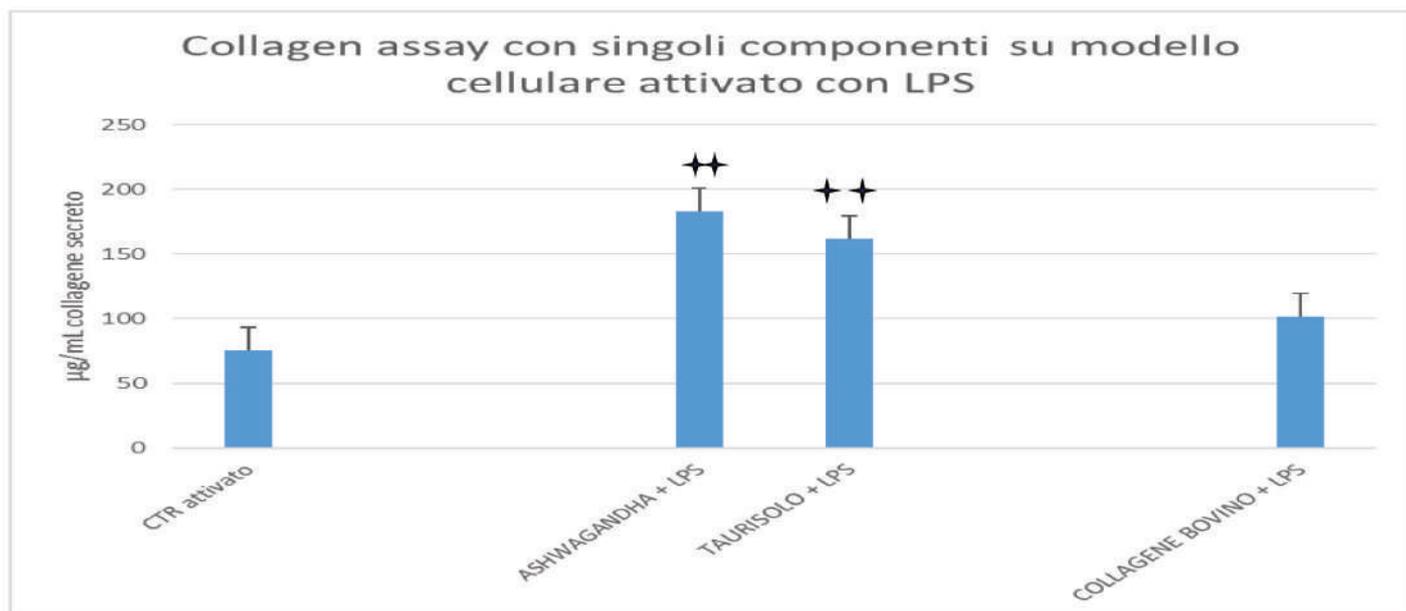


Fig 6B. Dosaggio del Collagene extracellulare secreto dal modello cellulare controllo in seguito al trattamento con i singoli componenti prescelti.

Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina.
Nutrizione e farmacia.
Vietata la diffusione al pubblico.

I dati preliminari ottenuti in seguito al trattamento del sistema modello, sia quello di controllo sia quello attivato con i singoli componenti, hanno permesso di proseguire la ricerca utilizzando gli stessi componenti in combinazione. Come riportato in Fig.7A l'impiego delle combinazioni sulle cellule di controllo non determina significativi incrementi di collagene secreto, in particolare sono state testate le combinazioni riportate nel grafico della figura 7.

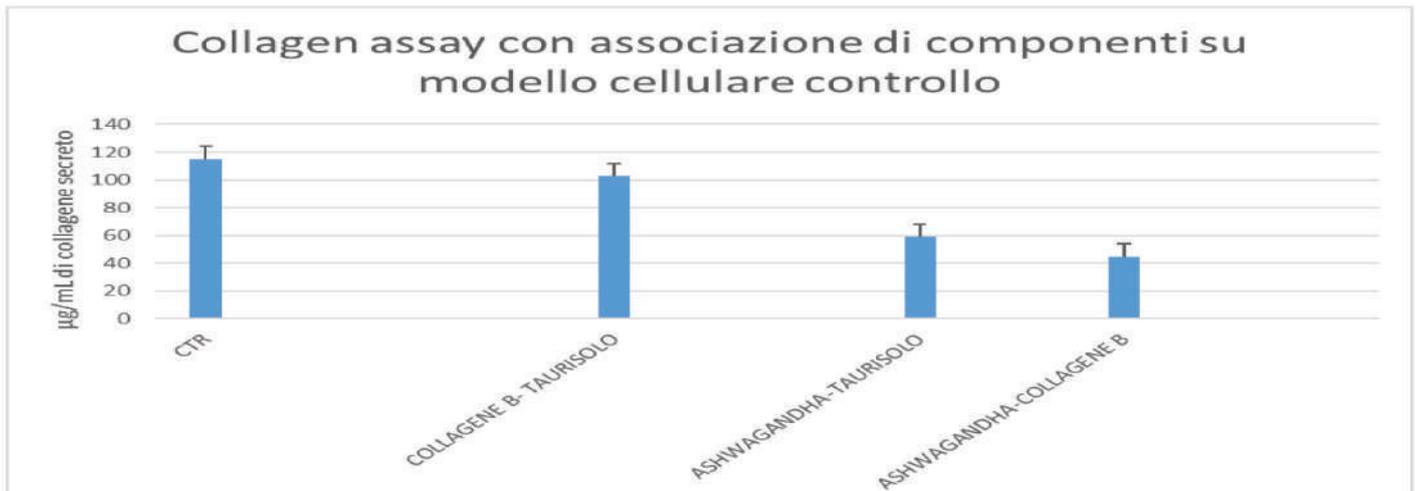


Fig 7A. Dosaggio del Collagene extracellulare secreto dal modello cellulare controllo in seguito al trattamento con la combinazione dei componenti prescelti.

Diversamente, nel modello attivato con LPS,

- ➔ L'associazione di Collagene Bovino (1 mg/mL) e Taurisolo® (1 mg/mL) ha determinato un rilascio di 81,8 µg/mL;
- ➔ in seguito al trattamento con l'associazione di Ashwagandha (1 mg/mL) e Taurisolo® (1 mg/mL) le cellule hanno rilasciato 112,56 µg/mL di collagene.

Le altre associazioni non hanno evidenziato incrementi di secrezione di collagene significativi rispetto alle cellule di controllo.

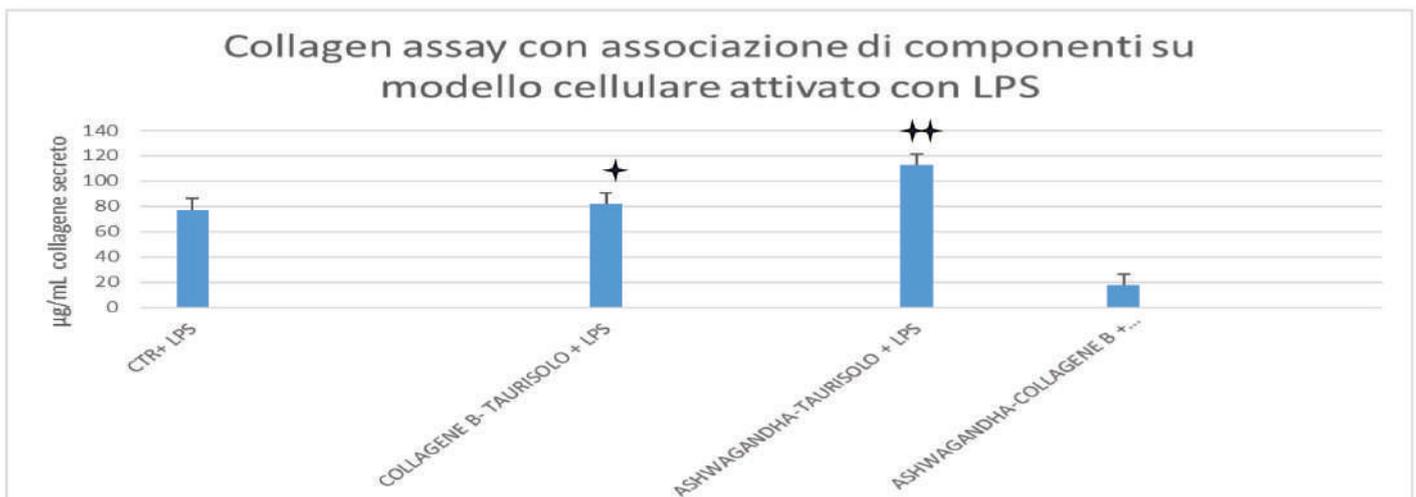


Fig 7B. Dosaggio del Collagene extracellulare secreto dal modello cellulare attivato con LPS in seguito al trattamento con la combinazione dei componenti prescelti.

Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina. Nutrizione e farmacia. Vietata la diffusione al pubblico.

B. DOSAGGIO DI COLLAGENE INTRACELLULARE

Allo scopo di valutare la concentrazione di collagene neosintetizzato all'interno delle cellule, è stato effettuato il dosaggio intracellulare di collagene (Fig.8). Come si evince dalla figura 8A relativa al dosaggio del collagene intracellulare, la combinazione Collagene Bovino-Taurisol® determina la sintesi di collagene la cui concentrazione aumenta a 140 µg/ml rispetto a quella di 88 µg/ml delle cellule di controllo.

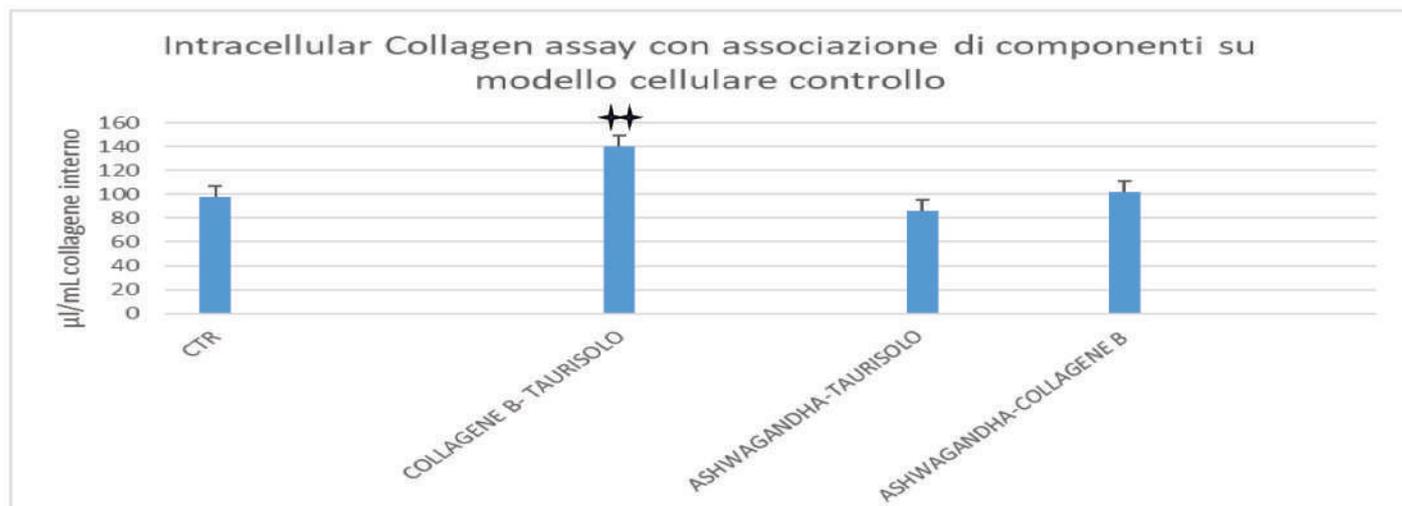


Fig. 8A. Dosaggio del Collagene intracellulare che si forma nel sistema modello di controllo a seguito del trattamento con la combinazione dei componenti prescelti.

Il dosaggio di collagene intracellulare sul modello sperimentale di cellule attivate mette in evidenza un incremento di collagene rispetto alle cellule attivate, ma non trattate con i componenti (controllo); in particolare la combinazione Ashwagandha - Collagene Bovino attiva la sintesi del collagene la cui concentrazione aumenta a 121 µg/mL; l'associazione Ashwagandha - Taurisol® induce un aumento della sintesi di collagene la cui concentrazione arriva a 155 µg/mL

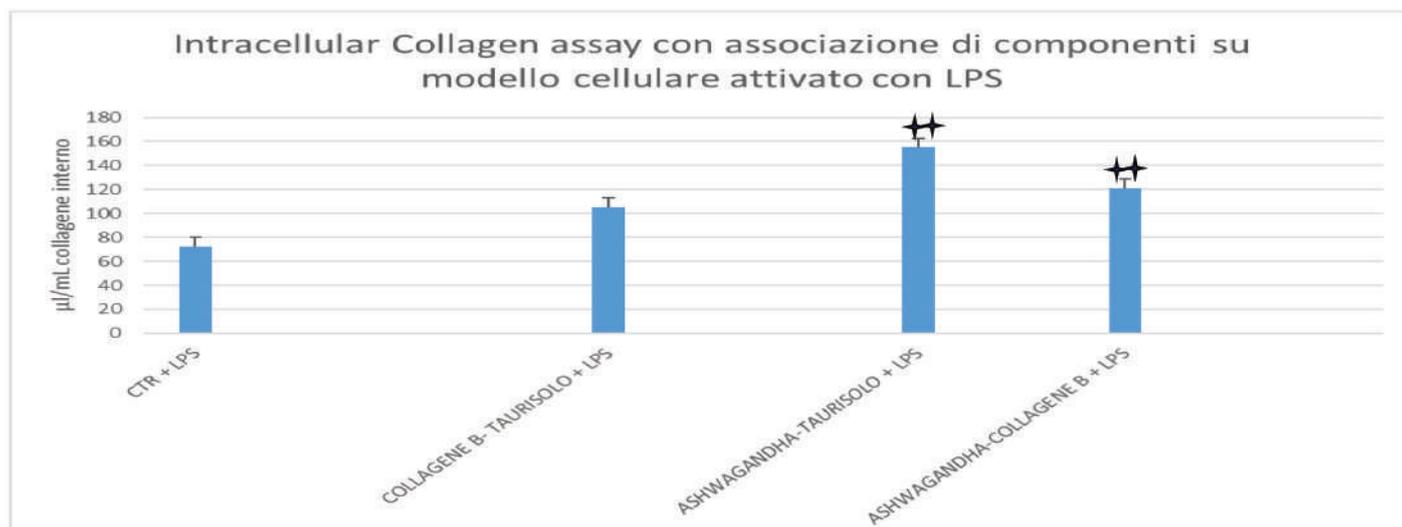


Fig. 8B. Dosaggio del Collagene intracellulare che si forma nel sistema modello attivato con LPS a seguito del trattamento con la combinazione dei componenti prescelti.

**Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina.
Nutrizione e farmacia.
Vietata la diffusione al pubblico.**

I risultati ottenuti nelle condizioni sperimentali sopra descritte permettono di ipotizzare che Taurisolo® e Ashwagandha siano i componenti più efficaci da combinare con il collagene per promuovere la sintesi intra- ed extracellulare di collagene. (Figure 7B e 8B).

CONCLUSIONI

In conclusione questi risultati, limitatamente alle condizioni sperimentali applicate, avvalorano l'efficacia dell'assunzione di Collagene bovino, Taurisolo® e Ashwagandha per incrementare la sintesi di collagene che normalmente subisce degradazione nelle patologie infiammatorie.

Nella formulazione del nuovo integratore REUMACOLLAGEN® è risultata efficace la combinazione di Collagene bovino FORTIGEL® (5 g), Taurisolo® (400 mg) e Ashwagandha (250 mg).

Napoli, 07 luglio 2020 Il Responsabile Scientifico della Convenzione di ricerca Prof.ssa Maria Daglia
Dipartimento di Farmacia – Università degli Studi di Napoli “Federico II” – via Domenico Montesano, 49 -80131 Napoli

BIBLIOGRAFIA

- Peng Thim Fan, Keng Hong Leong The use of biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis Ann Acad Med Singap. 2007 Feb;36(2):128-34.PMID: 17364080
- Koepp H, Eger W, Muehleman C, et al. Prevalence of articular cartilage degeneration in the ankle and knee joints of human organ donors. J Orthop Sci 1999;4: 407-412;
- Buckwalter JA, Lappin DR. The disproportionate impact of chronic arthralgia and arthritis among women. Clin Orthop Relat Res 2000:159-68
- Rheumatoid arthritis. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN.Cell. 1996 May 3;85(3):307-10. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81109-5. PMID: 8616886 Free article.
- Weisman SM, Matkovic V. Potential use of biochemical markers of bone turnover for assessing the effect of calcium supplementation and predicting fracture risk. Clin Ther. 2005 Mar;27(3):299-308. doi: 10.1016/j.dinthera.2005.03.003. PMID: 15878383 Review.
- Teresa Figueres Juher et al. Revisión de los efectos beneficiosos de la ingesta de colágeno hidrolizado sobre la salud osteoarticular y el envejecimiento dérmico. Nutr Hosp 2015;32[Supl.1]:62-66.
- Adam Mor, Steven B Abramson, Michael H. Pillinger. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. Clinical Immunology. Volume 115, Issue 2, May 2005, Pages 118-128
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1, 55-63.
- Ramakanth GSH et al. A randomized, double blind placebo controlled study of efficacy and tolerability of Withania somnifera extracts in knee joint pain J Ayurveda Integr Med 2016;7(3):151-157. doi: 10.1016/j.jaim.2016.05.003. Epub 2016 Sep 16.
- Chengappa R et al. Randomized placebo-controlled adjunctive study of an extract of Withania somnifera for cognitive dysfunction in bipolar disorder. J Clin Psychiatry 2013 Nov;74(11):1076-83.
- Pharmacologic overview of Withania somnifera, the Indian Ginseng. Nawab John Dar, Abid Hamid, Muzamil Ahmad. Cell Mol Life Sci 2015;72(23):4445-60.
- Effects of Grape Pomace Polyphenolic Extract (Taurisolo®) in Reducing TMAO Serum Levels in Humans: Preliminary Results from a Randomized, Placebo-Controlled, Cross-Over Study. Annunziata G, Maisto M, Schisano C, Ciampaglia R, Narciso V, Tenore GC, Novellino E. Nutrients. 2019 Jan 10;11(1):139. doi: 10.3390/nu11010139.PMID: 30634687
- Michael J Mienaltowski, David E Birk. Structure, physiology, and biochemistry of collagens. Adv Exp Med Biol. 2014;802:5-29

**Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina.
Nutrizione e farmacia.
Vietata la diffusione al pubblico.**

REUMA COLLAGEN®

integratore alimentare



Informazioni riservate esclusivamente alla classe medica e agli operatori qualificati della medicina.
Nutrizione e farmacia.
Vietata la diffusione al pubblico.



ISO 9001:2015

Prodotto in UE da **Farmin Laboratori Srl** Via Paolo Vasta, 9 - 95025 Aci Sant' Antonio (CT) per conto di **GEFO Nutrition Srl**
distribuito da **GEFO Nutrition Srl** - Via Conocchiella, 8 - 80078 Pozzuoli (NA)
tel. 0815245448 - 0815246299 - cel. 3299535390 - fax 0815246615
www.gefonutrition.it - info@gefonutrition.it