

# SAPIENZA Università di Roma

Domanda di finanziamento per Progetti di Ricerca di Università  
Anno 2008 - prot. C26A083EBS

## 1. Dati Generali

### 1.1 Durata della ricerca

24 mesi

### 1.2 Responsabile della ricerca

**MAZZANTI**  
(cognome)

**Gabriela**  
(nome)

**Prof. Ordinario**  
(qualifica)

**09/11/1950**  
(data di nascita)

**NESSUNA AFFERENZA**  
(facoltà)

(dip/istit)

(indirizzo)

**06/49912903**  
(telefono)

**06/49912480**  
(fax)

***gabriela.mazzanti@uniroma1.it***  
(e-mail)

### 1.4 Titolo della ricerca

*Studi tossicologici su preparati a base di piante medicinali e loro componenti, con particolare riguardo agli effetti epatotossici*

## 2. Informazione sull'attività di ricerca

### Area su cui insiste il progetto

05 - Scienze biologiche

### 2.1 Parole chiave

1. PIANTE MEDICINALI
2. EFFETTI AVVERSI
3. FITOSORVEGLIANZA
4. EPATOTOSSICITÀ
5. GENOTOSSICITÀ

## 2.2 Ambito della ricerca 2.3 Tipologia

Interfacoltà

Continuazione

## 2.4 Componenti il gruppo di ricerca (escluso il responsabile) Personale docente dell'Università

n°	Cognome	Nome	Qualifica	Facoltà	Dipartimento
1.	MAMMOLA	Caterina Loredana	PA	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. ANATOMIA UMANA
2.	MARIANI	Paola	RU	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. CHIRURGIA GENERALE, SPECIALITÀ CHIRURGICHE
3.	MARTINOLI	Lucia	PA	FARMACIA	DIP. FISILOGIA E FARMACOLOGIA
4.	VITALONE	Annabella	RU	FARMACIA	DIP. FISILOGIA E FARMACOLOGIA

## Altro personale dell'Università "Sapienza" di Roma

n°	Cognome	Nome	Qualifica	Facoltà	Dipartimento	Note
1.	DI SOTTO	ANTONELLA	Dottorando			
2.	MASTRANGELO	SABINA	Contrattista di ric.			
3.	D'AURIA	FELICIA DIODATA	Tecnico			

## Personale di altre Università/Istituzioni

n°	Cognome	Nome	Qualifica	Università/Istituzione	Dipartimento	Note
1.	MENNITI-IPPOLITO	FRANCESCA	Altro	Istituto Superiore di Sanità		
2.	SANTUCCIO	CARMELA	Altro	Agenzia Italiana del Farmaco		

## 2.5 Inquadramento della ricerca proposta (in ambito nazionale ed internazionale)

L'uso di prodotti a base di piante medicinali nel trattamento di svariati disturbi, o più semplicemente a scopo salutistico è sempre più diffuso. Secondo l'ultima indagine ISTAT oltre 2 milioni di persone, nel 2005, hanno fatto uso di prodotti a base di piante medicinali. Uno dei motivi principali alla base della preferenza per il prodotto erboristico è la convinzione che sia sicuro perché di origine naturale e in qualche modo validato dal cosiddetto "test del tempo". Ma l'origine naturale non è garanzia di sicurezza, lo dimostra il crescente numero di reports di eventi avversi da prodotti vegetali che giungono all'Uppsala Monitoring Centre dell'OMS: tale numero è più che triplicato negli ultimi 12 anni. Gli effetti avversi a droghe vegetali e loro derivati possono essere di varia natura: intrinseci alla droga stessa o connessi alle modalità di preparazione e di impiego. Al primo tipo appartengono le reazioni allergiche alle furanocumarine, contenute in diverse Asteraceae (*Angelica archangelica*, *Pimpinella anisum*, ecc.), o ai lattoni sesquiterpenici contenuti in *Anthemis nobilis*, *Taraxacum officinale*, *Tanacetum parthenium*, *Inula helenium*, ecc. (Barnes et al, *Herbal Medicine Pharmaceutical Press, London, 2007*) o agli acidi ginkgolici contenuti in *Ginkgo biloba* (Jaggy and Koch, *Pharmazie* 1997;52:735-8). Gli alcaloidi pirrolizidinici, contenuti in piante medicinali come la tussilagine (*Tussilago farfara*) e la consolida maggiore (*Symphytum officinale*), possono essere epatotossici ed epatocancerogeni (Kinghorn, 1983; Mei et al, *Br J Cancer* 2005;92:873-5). Altre sostanze vegetali come il saffrolo, il metileugenolo e l'estragolo sono considerate genotossiche e cancerogene, tanto che il loro uso come additivi alimentari è regolamentato (Rietjens et al, *Mut Res* 2005;574:124-138). Effetti avversi possono derivare dalla mancanza dei requisiti di qualità del prodotto: sostituzione, adulterazione e contaminazione. La sostituzione, in miscele dimagranti, della droga cinese *Stephania tetrandra* con l'*Aristolochia fangji* è stata causa di numerosi episodi di nefrotossicità per la presenza in quest'ultima di acidi aristolochici nefrotossici. Campioni di droghe cinesi sono risultati adulterati con caffeina, idroclorotiazide, paracetamolo, ecc... (Huang et al, *J Clin Pharmacol* 1997;37(4):344-50.; Koh and Woo *Drug Saf.* 2000;23(5):351-62; Keane et al, *BMJ* 1999; 318(7183):563-4); miscele di piante cinesi usate a scopo dimagrante sono risultate contenere sibutramina (Jung et al, *Forensic Science International* 2006;161: 221-2), inoltre è stata osservata la presenza di inibitori sintetici della fosfodiesterasi 5 in prodotti erboristici commercializzati per la disfunzione erettile (Fleshner et al, *J Urol* 2005; Poon et al, *Hong Kong Med J* 2007; 13: 359-63). Sono riportate anche contaminazioni di droghe vegetali con metalli pesanti, soprattutto in prodotti di provenienza asiatica (Hang and Lee, *Int J Toxicol.* 2007;26:433-9; Ko, *NEJM* 1998; 339:847). Altri tipi di contaminazione possono riguardare la presenza di residui di pesticidi o di tossine come le aflatoxine, prodotte da muffe durante la conservazione, o microrganismi, patogeni e non (Chan, *Chemosphere* 2003;52:1361-71; Leung et al, *Phytother Res* 2005;19:514-8; Kneifel et al, *Planta Med* 2002;68:5-15). La maggior parte delle reazioni avverse tuttavia deriva da un uso non corretto dei preparati a base di piante medicinali. Essendo questi considerati sicuri e non alla stregua di veri farmaci, vengono generalmente assunti per automedicazione, quindi al di fuori di ogni forma di controllo medico con conseguenti rischi. In questo contesto un problema che oggi desta notevole preoccupazione è rappresentato dalle possibili interazioni farmacologiche che sempre più frequentemente si verificano in seguito all'assunzione di prodotti a base di piante medicinali in associazione a farmaci convenzionali (Zhou et al, *Drug Met Rev*, 2003;35:35-98; Zhou et al, *Drug Met Rev* 2004;36:57-104; Hu et al, *Drugs* 2005;65:1239-82). A parte le interazioni farmacologiche tra iperico e farmaci, sicuramente le più note, altre interazioni estremamente importanti sono oggi riportate; ad esempio l'assunzione di preparati a base di *Salvia miltiorrhiza* o di *Angelica sinensis* può potenziare l'effetto anticoagulante del warfarin, esponendo il paziente a rischio di emorragia, mentre l'assunzione di preparati di aglio può ridurre i livelli ematici di farmaci antivirali quali il saquinavir, rendendo inefficace la terapia (Fugh-Berman, *Prev Cardiol.* 2000;3(1):24-32; Cheng, *South Med J.* 2005 Jul;98(7):748; Hu et al, *Drugs.* 2005;65(9):1239-82; Cranwell-Bruce, *Medsurg Nurs.* 2008;17(1):52-4).

La tossicità da prodotti vegetali può interessare praticamente tutti gli organi e apparati, ma il fegato è il primo bersaglio delle patologie iatrogene in quanto è un organo fondamentale nel metabolismo degli xenobiotici. Le principali categorie di agenti chimici che possono indurre danno epatico sono le epatotossine intrinseche, il cui effetto tossico è prevedibile, dose-dipendente e riproducibile sperimentalmente mediante il tetracloruro di carbonio, nonché le epatotossine con effetto tossico imprevedibile, dose-indipendente e non riproducibile sperimentalmente. La cellula epatica reagisce agli effetti tossici causati dagli xenobiotici che in genere innescano reazioni a catena da radicali liberi (lipoperossidazione) mettendo in atto meccanismi di difesa. Il blocco di questi meccanismi, quale l'esaurimento del glutatone, provoca l'epatotossicità. Talora gli xenobiotici provocano accumulo di lipidi e steatosi epatica oppure blocco della secrezione biliare e colestasi o iperbilirubinemia secondaria. Infine, la sostanza può comportarsi da aptene ed indurre una risposta autoimmune (epatotossicità su base allergica) provocando necrosi cellulare.

Diverse piante medicinali sono in grado di indurre danni epatici o sono sospettate di essere epatotossiche; tra queste il camedrio (*Teucrium chamaedris*), *Larrea tridentata*, *Arctostaphylos gummifera*, droghe contenenti antrachinoni come la cascara sagrada, la senna, *Polygonum multiflorum* (Loeper et al, *Gastroenterology* 1994;106:464-72; Stedman, *Semin Liv Dis* 2002;22:195-206; Chitturi and Farrel *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1093-9; Pittler and Ernst *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:451-71; Stükel et al, *J Hepatol* 2005;43:901-10; Mazzanti et al, *Ann Int Med* 2004;140(7):W30.

Recentemente numerosi casi di epatotossicità sono stati associati all'assunzione di integratori alimentari a base di tè verde (*Camellia sinensis*) generalmente assunti a scopo dimagrante; uno di questi prodotti (Exolise®) è stato anche ritirato dal commercio ma altri si affacciano continuamente sul mercato (Dandapanula et al,

*Drug Safety* 2008;31:469-84).

Da quanto detto si evince la necessità di studiare sistematicamente e monitorare le possibili reazioni avverse ai prodotti a base di piante medicinali, informarne il personale sanitario ed educare i pazienti ad un utilizzo più razionale degli stessi. A tal fine è stato avviato da alcuni anni un progetto di sorveglianza sugli eventi avversi da prodotti naturali condotto dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l'Ufficio di Farmacovigilanza dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) e rappresentanti di altre Istituzioni pubbliche tra cui la proponente (Gabriela Mazzanti). In questo contesto si inserisce il presente progetto di ricerca, che si propone di studiare la potenziale tossicità dei prodotti a base di piante medicinali o loro derivati, con particolare riguardo agli effetti epatotossici e mutageni. Per quanto riguarda gli effetti epatotossici in particolare, che sono oggetto del maggior numero di segnalazioni di effetti avversi, la ricerca si propone di verificare tanto l'eventuale tossicità diretta delle sostanze in esame quanto di individuare condizioni o trattamenti concomitanti responsabili di un danno epatico pur in assenza di una tossicità diretta del prodotto vegetale.

## 2.6 Sintesi del programma di ricerca e descrizione dei compiti dei singoli partecipanti

Il progetto si articola sui seguenti punti:

1. Studi di epatotossicità in vivo
2. Studi di mutagenesi in vitro
3. Monitoraggio degli effetti avversi a prodotti vegetali
4. Saggi di controllo su prodotti oggetto di segnalazione di evento avverso

*Studi di epatotossicità in vivo*

Saranno condotti sia studi di approfondimento sul *Chelidonium majus* che studi su nuove droghe e sostanze vegetali oggetto di segnalazione di evento avverso con manifestazione di epatotossicità. *CHELIDONIUM MAJUS*. Sulla base dei risultati ottenuti sul *C. majus* nel primo anno di ricerca (vedi Consuntivo scientifico dell'ultimo anno di finanziamento) saranno condotti studi al fine di evidenziare se la sostanza, che di per sé non ha mostrato di alterare la funzionalità epatica dopo trattamento prolungato, sia in grado di indurre danno epatico se somministrata in particolari situazioni, ad esempio insieme a particolari farmaci. A tale scopo saranno condotti esperimenti trattando gli animali (ratti) con l'estratto di *Chelidonium majus* in associazione a paracetamolo o tetracloruro di carbonio.

*DROGHE ANTRACHINONICHE*. Le droghe antrachinoniche (senna, aloe, cassia, ecc..) sono comunemente impiegate come lassativi, nondimeno gli antrachinoni sono anche contenuti in droghe utilizzate per scopi diversi, ad esempio come adattogeni o come anti-età (es. *Polygonum multiflorum*). I principi attivi, gli antrachinoni, nella forma agliconica vengono assorbiti, metabolizzati a livello epatico ed eliminati. I glucosidi degli antrachinoni essendo idrofili non vengono assorbiti dall'intestino tenue e vengono veicolati all'intestino crasso dove subiscono, ad opera degli enzimi della flora microbica intestinale, l'idrolisi e la riduzione ad antroni che rappresentano le forme attive. Gli antroni sono sostanze reattive che possono essere assorbiti dall'intestino e trasportati al fegato. Droghe contenenti antrachinoni come la cascara sagrada, l'aloë e *Polygonum multiflorum* sono state oggetto di segnalazione per effetti epatotossici (Nadir et al, *Am J Gastroenterol* 2000,95:3634-7; Rabe et al, *World J Gastroenterol* 2005,11:303-4; Mazzanti et al, *Ann Int Med* 2004,140(7):W30). Considerando le segnalazioni e il largo impiego di queste sostanze ci si propone di effettuare studi di epatotossicità su alcune di esse o su singoli antrachinoni.

Partecipanti alla ricerca: A. Di Sotto, C.L. Mammola, P. Mariani, S. Mastrangelo, G. Mazzanti, A.Vitalone.

*Studi di mutagenesi in vitro*

Nel primo anno di ricerca sono state esaminate alcune sostanze al fine di valutare il potenziale mutageno utilizzando cellule batteriche (test di Ames) (vedi Consuntivo scientifico dell'ultimo anno di finanziamento). Nel secondo anno di ricerca si proseguirà sottoponendo le sostanze saggiate ad un test su linfociti umani (test dei micronuclei). L'impiego di una batteria di due test in vitro per studiare il rischio genotossico di una sostanza è utile in quanto consente non solo di verificare l'eventuale induzione di danno genetico in sistemi cellulari distinti (batteri e cellule eucariote), ma anche di definire il tipo di danno indotto (mutazioni puntiformi a carico di uno o più geni, clastogenesi, aneuploidogenesi). I micronuclei sono piccoli nuclei accessori che possono derivare da frammenti di cromosomi o da cromosomi interi che si atardano durante i movimenti cellulari dell'anafase e conseguentemente sono esclusi dal nucleo principale. Essi sono indice di alterazioni cromosomiche associate a lesioni precoci indotte dall'esposizione ad un agente genotossico.

Partecipanti alla ricerca: A. Di Sotto, L. Martinoli, S. Mastrangelo

*Monitoraggio degli effetti avversi da prodotti vegetali*

Il progetto di sorveglianza sugli eventi avversi da prodotti naturali condotto dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l'Ufficio di Farmacovigilanza dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) e con rappresentanti di altre Istituzioni pubbliche tra cui la responsabile del presente progetto, proseguirà con la raccolta delle segnalazioni, l'esame dei singoli casi da parte del comitato scientifico e l'immissione nel database. Problemi di particolare interesse pubblico verranno segnalati all'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) e ad altre istituzioni di competenza. Su prodotti coinvolti in casi di particolare interesse saranno condotti saggi di controllo e studi tossicologici.

Partecipanti alla ricerca: G. Mazzanti, F. Menniti-Ippolito, C. Santuccio

*Saggi di controllo su prodotti oggetto di segnalazione di evento avverso*

Considerando che, come precedentemente descritto, la tossicità di un prodotto vegetale può essere dovuta anche a mancanza di qualità (sostanziazione, ecc..), qualora fosse possibile reperire i campioni del prodotto che hanno dato luogo ad un evento avverso, ci si propone di effettuare, sullo stesso, saggi atti a verificarne l'identità e la purezza (microbiologica, ecc...), applicando i metodi previsti dalla Farmacopea Ufficiale. Per problemi più specifici le competenze potranno eventualmente essere reperite in strutture esterne all'Ateneo, quali ad esempio l'Istituto Superiore di Sanità.

Partecipanti alla ricerca: A. Di Sotto, A.Vitalone.

### METODICHE SPERIMENTALI

*Studi di epatotossicità*

Verranno effettuati sulle sostanze in esame e parallelamente su sostanze epatotossiche di riferimento quali tetracloruro di carbonio e paracetamolo. L'epatotossicità sarà valutata nel ratto dopo somministrazione orale. Studi preliminari di tossicità acuta nel topo consentiranno di individuare il range di dosi da utilizzare nell'esperimento. Per gli studi di epatotossicità gruppi di 8 animali saranno trattati per 2 o 4 settimane con la sostanza in esame. Durante il periodo di trattamento sarà controllato a intervalli di 2-3 giorni il peso corporeo e il consumo di cibo.

Al termine del trattamento gli animali verranno sacrificati previa anestesia con etere. Sarà effettuato il prelievo del sangue e verrà eseguita la valutazione dei parametri di funzionalità epatica utilizzando strumentazioni di biochimica automatizzate e validate per specificità e sensibilità anche su campioni ematici di ratto. L'analisi degli enzimi: ALT, AST, & GT (gamma-glutamyl-transferasi), ALP, LDH, Colinesterasi; e della bilirubina totale e diretta sarà eseguita con il sistema COBAS 6000 (Roche Diagnostics, CH), che utilizza metodi fotometrici. Il profilo coagulativo: tempo di protrombina, tempo di tromboplastina parziale, fibrinogeno e D-dimeri; sarà misurato con l'apparecchio STA Compact (Roche Diagnostics, CH), che utilizza metodi cronometrici, cromogenici e immunometrici.

Si procederà quindi all'esame necroscopico della carcassa e dei visceri i quali, dopo l'osservazione in situ, saranno prelevati e pesati. Si determinerà il peso relativo dell'organo rispetto al peso corporeo di ciascun animale al momento del sacrificio e si preleveranno i campioni di fegato per l'esame istologico.

*Istomorfologia*. I frammenti di parenchima epatico, fissati per immersione in formalina tamponata al 10% per 24 h a temperatura ambiente, vengono sottoposti alle procedure di routine per l'inclusione in paraffina: disidratazione in etanolo a concentrazioni crescenti, diafanizzazione in xilolo ed inclusione.

Le sezioni seriate, di spessore standard pari a 3 µm, allestite con un microtomo rotativo Pabisch Top Automat S-140 e conservate in stufa a 37° C per 24 h vengono sottoposte, dopo sparaffinatura in xilolo e disidratazione in alcoli a concentrazioni decrescenti, a colorazioni con Ematossilina-Eosina, impregnazione argentea secondo Gomori per le fibre reticolari e tricromiche secondo Azan-Mallory e Masson per le fibre collagene.

Per l'esame immunocitochimico (Gaudio et al. *Gastroenterology* 2006, 130: 1270-82) i frammenti di parenchima epatico (5x5x5mm) fissati in formalina tamponata al 10% per 2 ore a T ambiente, vengono inclusi in paraffina. Sezioni dello spessore di 3 µm (raccolte su vetrini portaoggetti trattati con L-polilisina allo 0,1%) dopo sparaffinatura in xilolo e idratazione in alcoli decrescenti fino all'acqua, vengono trattate con perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 20 minuti al fine di bloccare l'attività della perossidasi endogena. Seguono lavaggio di 10 min in acqua corrente, tre lavaggi di 5 min ciascuno in tampone fosfato ed incubazione overnight a 4° C con i seguenti anticorpi primari:

° Citocheratine 18 e 19 (CK-18 e CK-19 Dako), markers specifici per epatociti e colangiociti;

° PCNA (proliferating cellular nuclear antigen): Dako, PC10, mouse monoclonal, per la valutazione dell'attività di proliferazione cellulare.

Si effettua inoltre una incubazione di due ore con l'anticorpo primario Alpha-SMA per HSCs alfa-Actin (1A4) per la valutazione dell'eventuale attivazione delle cellule stellate di Ito considerate il più importante tipo cellulare coinvolto nella fibrogenesi epatica.

Dopo tre lavaggi di 5' ciascuno in PBS le sezioni vengono incubate per 20' con l'anticorpo secondario appropriato a temperatura ambiente: biotinylated anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat immunoglobulins in PBS (DAKO).

Dopo tre lavaggi in PBS, viene aggiunto il complesso streptavidina-HRP (DAKO: Streptavidine conjugated to horseradish peroxidase in PBS) per 20 min. Per visualizzare l'avvenuta reazione viene utilizzato il cromogeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) in tampone imidazolo-HCl (pH 7,5) contenente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> controllando lo sviluppo al microscopio. Infine, lavaggio in acqua corrente per 10' e contrasto con Ematossilina di Mayer per 40 sec. Seguono viraggio in acqua corrente, disidratazione in alcool crescenti e montaggio con Eukitt.

Per la determinazione delle cellule in apoptosi verrà invece utilizzato il metodo TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated triphosphate end-labeling: ApopTag Kit, Oncor, USA). La procedura identifica le cellule in apoptosi nei campioni, marcando i terminali nucleotidici specifici liberati nel processo di frammentazione del DNA.

Per ciascuna immunoreazione vengono effettuati controlli negativi utilizzando siero non immune al posto dell'anticorpo primario.

**Morfometria.** L'analisi morfometrica viene effettuata per la valutazione quantitativa dell'espressione dei vari markers a livello delle cellule del parenchima epatico. Per ciascun fegato vengono effettuati cinque prelievi (5x5x5mm); su ciascun campione vengono predisposte cinque sezioni per ogni colorazione e per ogni immunoreazione. L'immunoreazione viene espressa come percentuale di cellule positive per l'antigene specifico, tale percentuale è ottenuta dal rapporto tra il numero delle cellule positive all'anticorpo ed il numero totale delle stesse. La misurazione viene effettuata in doppio cieco. Per l'alpha-SMA il numero delle HSCs positive e negative viene valutato per ciascuna sezione randomizzando 7-10 campi microscopici e contando solo le cellule il cui nucleo è visibile nella sezione. Viene quindi calcolata la percentuale delle HSCs alpha-SMA positive.

Relativamente all'analisi morfometrica della fibrosi epatica, sui campioni trattati con la tricromica di Masson, il tessuto connettivo colorato in verde viene calcolato come frazione del volume rispetto al residuo parenchima epatico. Le fibre collagene normalmente presenti negli spazi portali o nelle vene centrolobulari vengono incluse nella misurazione. Le osservazioni microscopiche e le immagini vengono acquisite mediante un microscopio ottico Leica DM 4500B, collegato ad una videocamera (ProgRes C10 plus) e corredato di un sistema di acquisizione ed analisi d'immagine (Delta Sistemi, Roma).

**Determinazione dei parametri dello stress ossidativo.** Saranno utilizzati anche campioni di parenchima epatico (0.5 g) omogenati in KCl (150 mM) (1:10 p/v), per determinazioni biochimiche di attività enzimatiche e parametri di funzionalità epatica legati allo stress ossidativo. Saranno valutati:

- Proteine totali, dosate con il metodo di Bradford (Bradford Anal Biochem, 72:248, 1976) (kit Sigma-Aldrich) per via spettrofotometrica (595nm).
- Livelli di glutazione ridotto (GSH), determinati nel sovrantante dopo aver precipitato le proteine centrifugando nel volume 1:1 omogenato e acido tricloroacetico al 10%. La determinazione viene eseguita allo spettrofotometro (415nm) mediante la reazione di Ellman (Van Dooran et al., Toxicol, 11:225-33, 1978).
- Livelli di malondialdeide (MDA), determinati spettrofotometricamente (450 nm) per reazione tra MDA e acido tiobarbiturico con formazione di un cromogeno rosa (Uchiyama e Mihara, Anal Biochem 86:271-8, 1978).
- Attività della superossidodismutasi (SOD), (SOD assay Kit-WST - Fluka) calcolata con un metodo indiretto colorimetrico (Ukeda et al, Anal Biochem 251:206-9, 1997).

**Studi di mutagenesi in vitro mediante il test del micronucleo**

Lo studio si esegue su colture cellulari di linfociti umani di sangue periferico, linee cellulari primarie caratterizzate da un cariotipo stabile e ben definito ed estremamente sensibili agli agenti mutageni e cancerogeni.

I linfociti umani di sangue periferico si isolano da "buffy coat" di donatori sani e non fumatori, preparato e certificato dall'AVIS. Le colture di linfociti si incubano per 44h a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> in ambiente saturo di vapor d'acqua. Dopo 44h si trattano con Citocalasina B al fine di bloccare la citodieresi. A 48h dall'allestimento delle colture, si effettua il trattamento con la sostanza in esame. Parallelamente si allestiscono anche colture dei controlli negativi (non trattate o trattate con il solvente della sostanza in esame) e positivi (mutageni noti). Al termine dell'incubazione (72h), le colture di linfociti si utilizzano per l'allestimento dei preparati citologici, da analizzare al microscopio ottico (ingrandimento 100x in immersione). Per ogni preparato si determina l'indice di divisione nucleare e la presenza di cellule in necrosi o in apoptosi. Esclusa la citotossicità, si determina la frequenza di micronuclei, di nucleoplasmic bridges" e di "nuclear buds". Il test del micronucleo si considera positivo se la sostanza induce, ad una o più concentrazioni, un aumento, statisticamente significativo, della frequenza di micronuclei nelle cellule binucleate rispetto al controllo (Fenech, Mut Res 2000; 455: 81-95).

Qualora la sostanza in esame risulti non mutagena può essere ulteriormente studiata per valutare gli eventuali effetti protettivi sull'aumento della frequenza dei micronuclei indotto da mutageni noti. L'effetto antimutageno viene studiato apportando delle variazioni al test del micronucleo (Fimognari et al, Environ Mol Mutag 2005; 46(4): 260-267). Al fine di verificare un'eventuale specificità d'azione della sostanza, si selezionano agenti che esplicano i loro effetti mutageni con meccanismi d'azione differenti. Mutageni di riferimento sono l'etilmetansulfonato, agente clastogeno e la colcemide, agente aneuploidogeno. Infine, per valutare il meccanismo d'azione che sottende l'eventuale azione antimutagena della sostanza in esame, si impiega uno schema di trattamento suddiviso in tre fasi temporalmente differenziate: pre-trattamento, co-trattamento e post-trattamento. La sostanza che induce, ad una o più concentrazioni, una riduzione statisticamente significativa della frequenza di micronuclei rispetto al controllo, è considerata antimutagena e pertanto potenzialmente protettiva verso il danno genotossico considerato.

**Monitoraggio degli effetti avversi a prodotti vegetali**

Per la raccolta delle segnalazioni sarà utilizzata la scheda in formato PDF scaricabile dal sito [www.epicentro.iss.it](http://www.epicentro.iss.it). Le schede raccolte saranno esaminate dal comitato scientifico di esperti per definire il giudizio di imputabilità ed effettuare, qualora necessario le opportune verifiche sperimentali.

Saggi di controllo su prodotti oggetto di segnalazione di evento avverso

Le metodiche (TLC, HPLC, analisi microscopica, ecc...) saranno scelte in funzione dello specifico prodotto da esaminare.

### 3. Elenco delle migliori pubblicazioni negli ultimi 5 anni

#### A) Pubblicazioni su riviste scientifiche

1. M. POLITI; A. BRACA; I. MORELLI; A. MANUNTA; L. BATTINELLI; G.MAZZANTI (2003). ANTIMICROBIAL DITERPENES FROM THE SEEDS OF CHEPHALOTAXUS HARRINGTONIA VAR. DRUPACEA. PLANTA MEDICA, vol. 69; p. 468-470, ISSN: 0032-0943
2. NOBILI F, FINOTTI E, MARTINOLI L., GARAGUSO I, AUDISIO M. (2004). Antioxidant capacity and morphological changes in monolayer CACO2 cells system by treatment with alpha-tocopherol and an oxidative compound. PFLUGERS ARCHIV. vol. 448, pp. R57-- ISSN: 0031-6768. I.F. 2.260.
3. G.MAZZANTI ; L.BATTINELLI; C. DANIELE; C.M. MASTROIANNI; M. LICHTNER; S. COLETTA; S. COSTANTINI (2004). NEW CASE OF HEPATITIS FOLLOWING THE CONSUMPTION OF SHOU WU PIAN, A CHINESE HERBAL PRODUCT DERIVED FROM POLYGONUM MULTIFLORUM. ANNALS OF INTERNAL MEDICINE, vol. 140(7); p. W-30, ISSN: 0003-4819
4. BIANCHI A; CANTU' P; FIRENZUOLI F; G.MAZZANTI ; MENNITI-IPPOLITO F; RASCHETTI R (2004). RHABDOMYOLYSIS CAUSED BY COMMIPHORA MUKUL, A NATURAL LIPID-LOWERING AGENT. THE ANNALS OF PHARMACOTHERAPY, vol. 38(7); p. 1222-1225, ISSN: 1060-0280
5. M. DE LEO; A. BRACA; N. DE TOMMASI; I. NORSCIA; I. MORELLI; L. BATTINELLI; G.MAZZANTI (2004). Phenolic compounds from Baseonema acuminatum leaves: isolation and antimicrobial activity. PLANTA MEDICA, vol. 70; p. 841-846, ISSN: 0032-0943
6. DANIELE C; DAHAMNA S; FIRUZI O; SEFKALI N; SASO L; G.MAZZANTI (2005). Atractylis gummiphora L. poisoning: an ethnopharmacological review. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, vol. 97(2); p. 175-181, ISSN: 0378-8741
7. F.D. D'AURIA; M. TECCA; V. STRIPPOLI; G. SALVATORE; L. BATTINELLI; G.MAZZANTI (2005). Antifungal activity of Lavandula angustifolia essential oil against Candida albicans yeast and mycelial form. MEDICAL MYCOLOGY, vol. 43(5); p. 391-396, ISSN: 1369-3786
8. EVANDRI M.G; BATTINELLI L; DANIELE C; MASTRANGELO S; BOLLE P; G.MAZZANTI (2005). The antimutagenic activity of Lavandula angustifolia (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, vol. 43(9); p. 1381-1387, ISSN: 0278-6915
9. TROMBETTA D; CASTELLI F; SARPIETRO M.G; VENUTI V; CRISTIANI M; DANIELE C; SAIJA A; G.MAZZANTI ; BISIGNANO G (2005). Mechanism of antibacterial action of three monoterpenes. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 49(6); p. 2474-2478, ISSN: 0066-4804
10. L. BATTINELLI; C. DANIELE; M. CRISTANI; A. SAIJA; G.MAZZANTI (2006). In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from Olea europaea L. fruit. PHYTOMEDICINE, vol. 13; p. 558-563, ISSN: 0944-7113
11. C. DANIELE; G.MAZZANTI ; M.H. PITTLER; E. ERNST (2006). Adverse-Event Profile of Crataegus Spp.- A Systematic Review. DRUG SAFETY, vol. 29(6); p. 523-535, ISSN: 0114-5916
12. MENNITI-IPPOLITO F; G.MAZZANTI ; SANTUCCIO C; MORO P; CALAPAI G; FIRENZUOLI F; VALERI A; RASCHETTI R (2008). SURVEILLANCE OF SUSPECTED ADVERSE REACTION TO NATURAL HEALTH PRODUCTS IN ITALY. PHARMACOEPIDEMIOLOGY AND DRUG SAFETY, vol. 17; p. 626-635, ISSN: 1053-8569

13. F. MENNITI-IPPOLITO; G. MAZZANTI; A. VITALONE; F. FIRENZUOLI AND C. SANTUCCIO (2008). SURVEILLANCE OF SUSPECTED ADVERSE REACTIONS TO NATURAL HEALTH PRODUCTS The case of propolis. DRUG SAFETY, vol. 31; p. 419-423, ISSN: 0114-5916
14. A. DI SOTTO; M.G. EVANDRI; G. MAZZANTI (2008). Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. MUTATION RESEARCH. GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS, vol. 653; p. 129-132, ISSN: 1383-5718, doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.04.004
15. G. MAZZANTI; BATTINELLI L.; DANIELE C.; COSTANTINI S.; CIARALLI L.; EVANDRI M.G (2008). Purity control of some Chinese crude herbal drugs marketed in Italy. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, ISSN: 0278-6915, doi: 10.1016/j.fct.2008.06.003
16. GUIZZETTI M, BORDI F, DIEGUEZ-ACUÑA FJ, VITALONE A., MADIA F, WOODS JS, COSTA LG. (2003). Nuclear factor kappaB activation by muscarinic receptors in astroglial cells: effect of ethanol. NEUROSCIENCE. vol. 120, pp. 941-950 ISSN: 0306-4522.
17. PIOVANO M, CHAMY MC, GARBARINO JA, TITA B, VITALONE A., DI FABIO A, NICOLETTI M. (2003). Cytotoxic activity of the root extract from *Myoschilos oblongum*. FITOTERAPIA. vol. 74, pp. 497-500 ISSN: 0367-326X.
18. VITALONE A., GUIZZETTI M, COSTA LG, TITA B. (2003). Extracts of various species of *Epilobium* inhibit proliferation of human prostate cells. JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY. vol. 55, pp. 683-690 ISSN: 0022-3573.
19. VITALONE A., MCCOLL J, THOME D, COSTA LG, TITA B. (2003). Characterization of the effect of *Epilobium* extracts on human cell proliferation. PHARMACOLOGY. vol. 69, pp. 79-87 ISSN: 0031-7012.
20. MAZZANTI G, DI SOTTO A, FRANCHITTO A, MASTRANGELO S, PEZZELLA M, VITALONE A., MAMMOLA CL. (2008). Effects of *Cimicifuga racemosa* extract on liver morphology and hepatic function indices. PHYTOMEDICINE. ISSN: 0944-7113. doi:10.1016/j.phymed.2008.02.023.
21. COSTA LG, AFSHARINEJAD Z, GIORDANO G, GUIZZETTI M, VITALONE A., KAVANAGH TJ. (2007). Organophosphorus insecticides and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY. vol. 219, pp. 181-189 ISSN: 0041-008X.
22. COSTA LG, FATTORI V, GIORDANO G, VITALONE A. (2007). An in vitro approach to assess the toxicity of certain food contaminants: methylmercury and polychlorinated biphenyls. TOXICOLOGY. vol. 237, pp. 65-76 ISSN: 0300-483X.
23. COSTA LG, VITALONE A., COLE TB, FURLONG CE. (2005). Modulation of paraoxonase (PON1) activity. BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY. vol. 69, pp. 541-550 ISSN: 0006-2952.
24. COSTA LG, ASCHNER M, VITALONE A., SYVERSEN T, SOLDIN OP. (2004). Developmental neuropathology of environmental agents. ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY. vol. 44, pp. 87-110 ISSN: 0362-1642.
25. MARTINOLI L., PALMERY M, ROMANELLI L, TUCCI P, MARINI P, FIORAVANTI AL, VALERI P. (2006). Some characteristics of A1 adenosine-receptor activation on rabbit jejunum spontaneous activity and withdrawal contraction. ACTA PHYSIOLOGICA. vol. 188, SUPPL. 652, pp. 46-- ISSN: 1748-1708. I.F. 2,230.
26. SARDELLA G, MARIANI P., D'ALESSANDRO M, DE LUCA L, PIERRO M, MANCONE M, PORRETTA A, ACCAPEZZATO D, FEDELE F, PAROLI M. (2006). Early elevation of interleukin-1beta and interleukin-6 levels after bare or drug-eluting stent implantation in patients with stable angina. THROMBOSIS RESEARCH. vol. 117, pp. 659-664 ISSN: 0049-3848.
27. CAVALLO MG, MONTALI A, MONETINI L, VALENTE L, MARIANI P., BIFOLCO M, ET AL. (2005). Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and its soluble receptor p75 (sTNF-R p75) in familial combined hyperlipidemia (FCHL). NUTRITION METABOLISM AND CARDIOVASCULAR DISEASES. vol. 15, pp. 262-269 ISSN: 0939-4753.
28. PAROLI M, MARIANI P., ACCAPEZZATO D, D'ALESSANDRO M, DI RUSSO CRISTIAN, BIFOLCO M, SIRIAN I, FEDELE F, BRUNO G, SARDELLA G. (2004). Modulation of Tachykinin and cytokine release in patients with coronary disease undergoing percutaneous revascularization. CLINICAL IMMUNOLOGY. vol. 112, pp. 78-84 ISSN: 1521-6616.
29. F. NOBILI, I. GARAGUSO, MARTINOLI L., M. AUDISIO. (2007). Effect of different concentrations of a polyphenolic extract of the extravirgin olive oil, using cellular culture monolayer of adenocarcinoma of the human colon (CaCo2). ACTA PHYSIOLOGICA. vol. 191, SUPPL.657, pp. 100-- ISSN: 1748-1708. I.F. 2,230.
30. M. PALMERY, MARTINOLI L., P. MARINI, V. IPAVEC, A. FIORAVANTI, P. VALERI. (2007). Effect of 4-aminopyridine (4AP) and tetraethylammonium (TEA) on the expression of mu-opioid acute dependence in guinea pig ileum. ACTA PHYSIOLOGICA. vol. 191, SUPPL. 657, pp. 100-101 ISSN: 1748-1708. I.F. 2,230.
31. F. NOBILI, E. FINOTTI, MARTINOLI L., I. GARAGUSO, M. AUDISIO. (2006). Antioxidant capacity and morphological changes in monolayer CaCo2 cells system by treatment with polyphenolic compounds extracted from virgin olive oil and an oxidative compound. Preliminary study. ACTA PHYSIOLOGICA. vol. 188, SUPPL. 652, pp. 199-- ISSN: 1748-1708. I.F. 2,230.
32. MARTINOLI L., M. PALMERY, L. ROMANELLI, P. TUCCI, D. DANTE, P. VALERI. (2006). Physiological neuronal cholinergic antagonism of isoproterenol inhibitory effect on rabbit jejunum spontaneous activity. ACTA PHYSIOLOGICA. vol. 188, SUPPL. 652, pp. 231-- ISSN: 1748-1708. I.F. 2,230.
33. PALMERY M, MARTINOLI L., MARINI P, AMICO MC, FIORAVANTI A, VALERI P. (2006). Withdrawal to acute adenosine A1 receptor activation: role of opioid and cannabinoid CB1 receptors. ACTA PHYSIOLOGICA. vol. 188, SUPPL. 652, pp. 159-- ISSN: 1748-1708. I.F. 2,230.
34. L.BATTINELLI; F.MENGGONI; M.LICHTNER; G.MAZZANTI; A.SAJJA; C.M.MASTROIANNI; V.VULLO (2003). EFFECT OF LIMONIN AND NOMILIN ON HIV-1 REPLICATION ON INFECTED HUMAN MONONUCLEAR CELLS. PLANTA MEDICA, vol. 69; p. 910-913, ISSN: 0032-0943

## B) Pubblicazioni di volumi o saggi in volume

1. MARTINOLI L. (in stampa). NUTRIZIONE E METABOLISMO. In: G.L. MONTICELLI, A. CARETTA, S. FULLE, A. MINELLI, S.VASSANELLI, L. MARTINOLI, P. MARCIANI. FISILOGIA. (vol. -, pp. -). ISBN: 978-88-08-18332-3. MILANO: CASA EDITRICE AMBROSIANA (ITALY). IN PRESS.
2. MARTINOLI L. (in stampa). I COMPONENTI DELL'ORGANISMO UMANO. In: G.L. MONTICELLI, A. CARETTA, S. FULLE, A. MINELLI, S.VASSANELLI, L. MARTINOLI, P. MARCIANI. FISILOGIA. (vol. -, pp. -). ISBN: 978-88-408-1394-3. MILANO: CASA EDITRICE AMBROSIANA (ITALY). IN PRESS.

## C) Pubblicazioni su atti di convegni e congressi

1. EVANDRI MG, BOLLE P, AURELI P, ANNIBALLI F, MARTINOLI L. (2003). *Daphnia Magna* as a new approach in the detection of botulinum toxins. 31 Congresso Nazionale della SIF. 26-29 giugno 2003.
2. FENICIA L, ANNIBALLI F, BOLLE P, EVANDRI M.G, MARTINOLI L., AURELI P. (2006). Detection of botulinum neurotoxins using *daphnia magna* toxicity test. ICCVAM/NICEATM/ECVAM SCIEN WORKS ALTERN METH REF RED OR REP MOUSE LD50 BIOAS BOTUL TOX TESTING. 13-14 NOVEMBER.

## D) Altro (pubblicazioni non previste nei punti precedenti)

### 4. Richiesta di finanziamento del progetto

## Note (specificare in dettaglio le spese)

<p><b>4.1 A) Totale spese per l'acquisto di apparecchiature scientifiche</b></p> <p><b>4.2 B) Spese generali per la ricerca</b></p> <p>4.2.1 Materiali di consumo e manutenzione strumenti (specificare il tipo di materiale e la strumentazione utilizzata)</p> <p>4.2.2 Missioni - Seminari</p> <p>4.2.3 Raccolta, codifica e elaborazioni dati</p> <p>4.2.4 Altre voci:</p>	<p>€</p> <p>€ 27.000</p> <p>€</p> <p>€ 1.000</p> <p>€</p> <p>€</p>	<p>Animali da laboratorio, sostanze chimiche (metilmetansulfonato, colcemide,etilmetansulfonato, 2-aminoantracene, 2-nitrofluorene, sodioazide, fitoemoagglutinina, albumina), reagenti (acido tiobarbiturico, reattivo di Bradford, reattivo di Ellman, ecc.), solventi, kit per immunoistochimica, kit per determinazione dell'attività enzimatica, materiale sterile monouso, vetreria, terreni di coltura, preparato di enzimi microsomiali epatici (S9), siero fetale bovino, transgel veicolante per somministrazione orale nel ratto. Manutenzione apparecchiature: cappa a flusso laminare, incubatore, bilance, centrifughe, spettrofotometro, deionizzatore, microscopio ad immersione, cappa chimica.</p> <p>Partecipazione a congressi nazionali e internazionali</p>
--	--	---

TOTALE A+B 28.000

**4.3 C) Collaborazioni di ricerca (l'importo fisso di 1.550 €, lordo al mese, per un max di 12 mesi) €**

### 4.4 Ultimi tre anni di finanziamenti ottenuti per ex Progetti di Ateneo

Anno	Fondo assegnato	Fondo non ancora utilizzato
4.4.1 2004	Voce A 0	Voce A
	Voce B 20.000	Voce B
	Voce C 0	Voce C

---

Anno	Fondo assegnato	Fondo non ancora utilizzato
4.4.2 2005	Voce A 0	Voce A 0
	Voce B 14.725	Voce B 0
	Voce C 17.670	Voce C 0

La necessità di un collaboratore esterno è stata motivata dalla impossibilità di reperire in ambito universitario le risorse umane e le competenze necessarie alla ricerca oggetto del finanziamento. Il contratto di collaborazione esterna finanziato nell'anno 2005 è stato assegnato, con concorso pubblico effettuato in data 07.12.2006, alla Dott.ssa Sabina Mastrangelo, per il periodo 01.01.2007 - 31.12.2007.

La dott.ssa Mastrangelo si è laureata in Farmacia nell'Università di Roma nel 2002. Ha conseguito l'abilitazione alla professione di farmacista nel 2003 e il Diploma di Dottorato di ricerca in "Farmacologia Clinica e Terapia Medica" presso l'Università di Bari nel 2007. Durante il corso di Dottorato ha svolto un periodo di formazione in Germania presso il Dipartimento di Tossicologia e Chimica degli Alimenti dell'Università di Karlsruhe. Ha padronanza nelle tecniche in vitro per lo screening del potenziale tossicologico e in particolare genotossicologico: test di inibizione di crescita algale su *Selenastrum capricornutum*, test di tossicità acuta e cronica su *Daphnia magna*, test di Ames, saggio citogenetico su *Allium cepa* per la clastogenicità. Conosce anche tecniche di coltura cellulare su fibroblasti murini (V79), su linee cellulari MCF7 di tumore mammario e su linee cellulari Ishikawa di tumore endometriale.

Nell'ambito del contratto di collaborazione la dott.ssa Mastrangelo ha lavorato alla messa a punto di metodiche per lo studio dell'epatotossicità di prodotti vegetali in vivo. Tali metodiche consentono di valutare lo stress ossidativo su omogenato di fegato proveniente da animali (ratti) trattati con la sostanza in esame. I parametri misurati sono stati i livelli di malondialdeide (MDA) e di glutazione ridotto (GSH) e l'attività della superossidodismutasi (SOD). La MDA è uno degli indici di perossidazione lipidica, processo radicalico che porta alla distruzione delle membrane plasmatiche, mentre il GSH e la SOD sono due dei sistemi detossificanti per radicali liberi presenti a livello cellulare, e in particolare negli epatociti.

Queste metodiche sono state utilizzate per saggiare in primo luogo sostanze di riferimento notoriamente epatotossiche (paracetamolo, tetracloruro di carbonio, alfa-naftilisotiocianato). In particolare, il paracetamolo è stato scelto come controllo positivo per gli esperimenti successivi.

Per quanto concerne lo studio di sostanze potenzialmente epatotossiche, l'analisi dello stress ossidativo è stata effettuata su omogenati di fegato di ratti trattati con un estratto secco idroalcolico di radice di *Cimicifuga racemosa* e con un estratto idroalcolico di parti aeree di *Chelidonium majus*. La scelta delle sostanze si è basata su recenti casi di reazioni epatiche avverse riportati in letteratura. Per quanto riguarda *C. racemosa*, l'unico parametro dello stress ossidativo alterato è risultato il GSH, moderatamente ridotto rispetto al controllo. Per quanto concerne *C. majus*, l'analisi dell'omogenato di fegato ha mostrato, anche per questo estratto, una diminuzione dose-dipendente del contenuto di GSH e dell'attività della SOD.

2006: Nessun finanziamento

## 4.5 Consuntivo scientifico per l'ultimo anno di finanziamento ottenuto (risultati e pubblicazioni relative)

Il progetto di ricerca finanziato nel 2007, che si propone di studiare la potenziale tossicità dei prodotti a base di piante medicinali o loro derivati, prevedeva:

1. Studi di epatotossicità
2. Studi di mutagenesi
3. Monitoraggio degli effetti avversi da prodotti vegetali
4. Saggi di controllo su prodotti oggetto di segnalazione di evento avverso.

Vengono di seguito riassunti i principali risultati conseguiti nel primo anno, sottolineando la difficoltà nel condurre una tale sperimentazione con l'esiguo finanziamento ottenuto.

### STUDI DI EPATOTOSSICITÀ

Gli studi sono stati condotti su *Cimicifuga racemosa* e *Chelidonium majus*, due droghe sospette di indurre epatotossicità e oggetto di segnalazione per evento avverso di natura epatotossica. Le droghe sono state utilizzate sotto forma di estratto e somministrate per via orale in ratti Wistar maschi.

**CIMICIFUGA RACEMOSA.** L'estratto idroalcolico (EPO, Milano) standardizzato in glicosidi triterpenici (2,5%, calcolati come 27-deossiacetina) e somministrato nel ratto alla dose di 300 mg/Kg/die (circa 200 volte la dose nell'uomo) per 30 giorni, non ha modificato, rispetto ai controlli, gli indici di funzionalità epatica (AST, ALT; gamma-GT, ALP, bilirubina totale e diretta) ma ha ridotto i livelli epatici di glutazione. L'esame istomorfologico e immunoistochimico del fegato degli animali trattati non ha mostrato alterazioni significative.

**CHELIDONIUM MAJUS.** Gli animali sono stati trattati con l'estratto alle dosi di 1,5 e 3 g/kg/die (dosi circa 50 e 100 volte superiori a quelle impiegate nell'uomo) per 28 giorni. L'analisi ematochimica non ha evidenziato, rispetto ai controlli, alcuna alterazione nei parametri considerati (bilirubina, ALP, AST, ALT, gamma-GT, proteine totali, LDH, PT, PTT). All'esame istomorfologico, l'architettura del parenchima epatico si presentava conservata. Sono state invece osservate una riduzione statisticamente significativa e dose-dipendente dei livelli di GSH e dell'attività della SOD ed una tendenza all'aumento dei livelli di MDA.

I risultati ottenuti da questo studio suggeriscono quindi una sicurezza d'impiego di queste due droghe, tuttavia l'osservata capacità di indurre stress ossidativo impone cautela nel loro impiego. I casi di sospetta epatotossicità osservati vanno probabilmente messi in relazione a particolari situazioni fisiologiche o patologiche del soggetto o a possibili terapie concomitanti.

### STUDI DI MUTAGENESI

Gli studi sono stati condotti mediante il test di Ames nei ceppi di *S. typhimurium* TA 98 e TA 100 e di *E. coli* WP2uvrA, in presenza ed assenza del sistema di attivazione metabolica (S9).

Sono stati studiati i monoterpeni linalolo e linalil acetato e il sesquiterpene beta-caryophyllene, utilizzati come additivi nell'industria alimentare e profumiera per le loro fragranze, e il diterpenoide 3,4-secoisopimar-4(18),7,15-trien-3-oic acid (SCB-58), isolato da *Salvia cinnabarina*.

Linalolo, beta-cariofillene, SCB-58 non sono risultati mutageni, sia in assenza che in presenza di S9; linalil acetato è risultato mutageno in WP2uvrA, con e senza S9.

Le sostanze risultate sprovviste di effetti mutageni sono state esaminate per valutare un eventuale effetto protettivo verso mutageni noti come 2-nitrofluorene (2NF), metilmetansulfonato (MMS), sodioazide (SA) e 2-aminoantracene (2AA). Nel test di antimutagenesi beta-cariofillene ha ridotto significativamente l'effetto mutageno del 2NF e del MMS. SCB-58 ha ridotto il numero di colonie revertenti mutageno-indotte in tutti i ceppi, inoltre, ha mostrato di ridurre significativamente anche i revertenti spontanei in TA 100 e in TA 98.

L'assenza di effetti genotossici del linalolo conferma la sicurezza di impiego del prodotto; l'effetto mutageno del linalil acetato in WP2uvrA va ulteriormente indagato. L'attività antimutagenica di beta-cariofillene e SCB-58 è un interessante punto di partenza per lo studio di queste sostanze come chemopreventer.

### MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI AVVERSI DA PRODOTTI VEGETALI

Il progetto di sorveglianza sugli eventi avversi da prodotti erboristici è proseguito con la raccolta delle segnalazioni che nell'ultimo anno sono state circa 50.

Particolare interesse hanno destato 2 casi: 1) epatite acuta tossica in una paziente di 72 anni che assumeva l'integratore EPINERVE® a base di epigallocatechina gallato (da *Camelia sinensis*) per ridurre la pressione intraoculare: la reazione si è risolta dopo un periodo di ospedalizzazione; 2) epatite acuta in un bambino di 10 anni che assumeva da alcuni mesi un integratore (MYOOPS®) a base di luteina, Vit. A, Vit. E, antocianosidi da *Sambucus nigra* e oligomeri procianidolici da *Vitis vinifera*, per migliorare la vista: la reazione è stata molto grave, il paziente è ora in attesa di trapianto di fegato. Tali eventi sottolineano la necessità di monitorare gli effetti avversi a prodotti naturali.

### SAGGI DI CONTROLLO SU PRODOTTI OGGETTO DI SEGNALEZIONE

Sono stati eseguiti dei saggi chimici sul campione di *Chelidonium majus* oggetto di segnalazione e utilizzato per le prove di epatotossicità. I saggi sono stati effettuati in conformità alla monografia della droga riportata nella Farmacopea Europea (5a edizione, 2005). In particolare è stata eseguita una cromatografia su strato sottile come saggio di riconoscimento ed è stata effettuata la titolazione degli alcaloidi, espressi come chelidonina. I risultati ottenuti hanno permesso di identificare il campione e di definire il contenuto in alcaloidi corrispondente allo 0,37%: tale contenuto rientra nel range riportato per questa droga anche se è inferiore rispetto a quello richiesto dalla Farmacopea Europea (non inferiore allo 0,6%). Questi saggi hanno permesso di caratterizzare l'estratto utilizzato nelle prove biologiche e di escludere che la sospetta epatotossicità fosse dovuta ad un elevato contenuto di alcaloidi.

Pubblicazioni del primo anno di finanziamento

#### 1) SURVEILLANCE OF SUSPECTED ADVERSE REACTION TO NATURAL HEALTH PRODUCTS IN ITALY

Menniti-Ippolito F, Mazzanti G, Santuccio C, Moro P, Calapai G, Firenzuoli F, Valeri A, Raschetti R.

Pharmacoepidemiol Drug Saf 2008; 17:629-35. (IF 2,155)

#### 2) SURVEILLANCE OF SUSPECTED ADVERSE REACTIONS TO NATURAL HEALTH

