



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

ASCORBATO DI POTASSIO CON RIBOSIO

raccolta di pubblicazioni



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

ASCORBATO DI POTASSIO

L'interesse per l'agente antiossidante ascorbato di potassio (sale derivato dall'acido ascorbico) è legato agli straordinari effetti contro le patologie degenerative, ed i tumori in particolare, perché agisce per ripristinare il corretto equilibrio di potassio intracellulare, alterato dalla patologia degenerativa.

L'importanza del potassio per il metabolismo cellulare e la sua carenza nelle patologie degenerative è nota in letteratura fin dagli anni '30. Durante la degenerazione, c'è una perdita di potassio intracellulare a vantaggio del sodio (alterazione della pompa sodio/potassio), con conseguente sbilanciamento elettrolitico. Questo evento, che completa una catena di processi biochimico-fisici complessi, ha un peso decisivo nella proliferazione incontrollata delle cellule degenerate perché il potassio è un elemento che gioca un ruolo decisivo nella regolazione dell'attività metabolica di enzimi e proteine.

La perdita di potassio è legata ad una degradazione di particolari strutture proteiche ed enzimatiche conosciute con il nome di *anelli pirrolici* e l'unico modo per reintegrare questa perdita è attraverso la somministrazione di ascorbato di potassio.

L'acido ascorbico, oltre all'effetto antiossidante, si comporta da veicolo di trasferimento intracellulare per il potassio ed è in grado di sostituire le strutture pirroliche degradate.

Nell'esperienza del Dott. Pantellini questi fatti producono un arresto nel processo di proliferazione incontrollata, un riequilibrio degli elettroliti con ripristino del corretto metabolismo cellulare ed un ripristino del corretto funzionamento cellulare.

L'ascorbato di potassio non è una metodica alternativa perché agisce sui meccanismi cellulari fondamentali e può essere considerata come una metodica biochimica di base.

L'ascorbato di potassio si ottiene per soluzione acquosa estemporanea a freddo dei due componenti acido l-ascorbico e bicarbonato di potassio cristallizzati purissimi. Questi devono essere conservati in bustine predosate e sigillate preparate sotto vuoto e con bassa percentuale di umidità ambientale. L'involucro delle bustine di entrambi i componenti deve essere di alluminio, polietilene e carta in quanto questi sono fortemente igroscopici e l'acido l-ascorbico è anche altamente fotosensibile.

Si sconsiglia l'utilizzo di bustine semplici in carta o di capsule perché il prodotto corre il rischio di degradarsi rapidamente. Inoltre, per le capsule spesso è necessario ricorrere a degli eccipienti (come il lattosio) che tolgono purezza ai componenti e rendono il prodotto decisamente poco efficace. La verifica sta nelle difficoltà di solubilità e nell'assenza di effervescenza in soluzione.

Quando si scioglie in acqua il prodotto deve "mussare" (effervescenza). Evitare di miscelare il composto (che comunque si scioglie completamente in breve tempo) con cucchiaini metallici per evitare anche il minimo rischio di ossidazione dell'acido l-ascorbico. Se necessario si possono utilizzare palettine in plastica o legno oppure il semplice movimento della mano per far muovere l'acqua nel bicchiere.

Il **dosaggio medio** di ascorbato di potassio consigliato a livello di **prevenzione** è inferiore ad 1 grammo per settimana, ma in ogni caso dipende dalla valutazione dei dati ematochimici, dell'anamnesi remota e dei fattori di rischio di ciascun soggetto.

Dott. Guido Paoli
Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini

Prof.ssa Ida Ortalli
Dipartimento Sanità Pubblica
Università di Parma



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

La Fondazione Pantellini

La Fondazione Internazionale Valsé Pantellini per la Ricerca e lo Studio delle Malattie Degenerative è nata nel 1998 per onorare e continuare gli studi e le ricerche **sull'ascorbato di potassio** (sale derivato dall'acido ascorbico) iniziati alla fine degli anni '40 dal biochimico fiorentino Gianfrancesco Valsé Pantellini. L'interesse per questa molecola, fortissimo agente antiossidante, è legato agli **straordinari effetti contro le patologie degenerative ed i tumori** in particolare perché agisce per ripristinare, attraverso l'acido ascorbico, il corretto equilibrio di potassio intracellulare (elemento importantissimo per regolare tutto il metabolismo cellulare), alterato dalla patologia degenerativa. Recentemente nel composto è stato introdotto il **ribosio** (novità assoluta in campo mondiale) per potenziarne

l'azione.

La metodica non è alternativa ai protocolli ospedalieri.

L'ascorbato di potassio continua a suscitare l'interesse scientifico degli enti con cui la Fondazione è in contatto, in particolare **la Sezione di Mutagenesi ed Ecotossicità (Responsabile Prof. Giorgio Bronzetti)** dell'Istituto di Mutagenesi e Differenziamento del CNR di Pisa, ora confluito nell'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria del CNR, ed il **Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università di Parma (Direttore Prof.ssa Ida Ortalli)**, in cui è confluito l'Istituto di Scienze Fisiche. Dalle ricerche sono stati evidenziati: 1) la non tossicità né genotossicità del composto; 2) le sue caratteristiche protettive. Inoltre stanno emergendo anche le sue caratteristiche antimutagene.

Una collaborazione è stata attivata anche con il **Dipartimento di Anatomia dell'Università degli Studi di Malta (Prof.ssa Maria Teresa Camilleri Podestà)**.

La Fondazione Internazionale Valsé Pantellini è senza scopo di lucro ed i principali obiettivi definiti nello Statuto sono:

- *Sviluppare lo studio dei meccanismi biochimici, biologici ed immunologici della patologia della malattia.*
- *Promuovere, coordinare e curare direttamente o indirettamente ricerche sperimentali e cliniche.*
- *Favorire rapporti di studio e ricerche coordinate a livello nazionale ed internazionale.*
- *Applicare a livello preventivo e terapeutico le indicazioni scientifiche.*
- *Approfondire e sviluppare le problematiche di primaria importanza salute-uomo-natura, con particolare attenzione agli aspetti medici, ecologici, sociali e culturali.*
- *Operare con ogni mezzo per la tutela e la difesa della salute dell'uomo.*
- *Divulgare, direttamente o indirettamente, la pubblicazione dei risultati delle proprie ricerche, nonché l'edizione di libri ed opere non editi o non rinvenibili nei circuiti librari*

La Fondazione Internazionale Valsé Pantellini - sede italiana - è a Firenze, in via Mattioli 55
tel. 055 499634 (anche fax) – 055 491835

Internet: <http://pantellini.org> e-mail: fondazione@pantellini.org

Per chi volesse contribuire all'attività della Fondazione, il numero di conto corrente postale è il seguente: 23677503 – intestato a Fondazione Valsé Pantellini sede italiana - via Mattioli 55 – 50139 Firenze



Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative

Gianfrancesco Valsé Pantellini: cenni biografici

Nasce il 2 aprile 1917 a Rufina, un piccolo paese della Toscana dove vive fino al 1929 con il padre Italo e la madre Margherita.

L'istinto di suo padre, che era medico, e la curiosità di ragazzo lo portarono sulla strada della ricerca scientifica; cominciò a dedicarsi a studi di elettrochimica con la complicità del farmacista del paese. Proseguì i suoi studi a Firenze, prima al collegio La Querce poi al liceo Michelangelo dove conseguì la licenza liceale da privatista, facendo tre anni in uno solo. Nel 1936 si iscrisse all'Università di Firenze, Facoltà di Chimica pura ad indirizzo organico biologico. I suoi studi furono interrotti dalla guerra ma egli fu sempre attivo prestando servizio come ufficiale chimico nel Genio Guastatori; ebbe varie destinazioni tra cui Udine, Russia, Francia. Nel 1943 conobbe a Roma il famoso matematico Luigi Fantappiè. Finita la guerra riprese gli studi universitari a Firenze laureandosi nel 1947 in Chimica pura ad indirizzo biologico.

Poi per un anno frequentò l'Istituto di Fisica Teorica di Napoli. A Parigi conobbe il chimico Louis Kervran ed approfondì le sue ricerche sulla fusione a freddo nel corpo umano. Rientrato a Firenze passò ad Ancona al centro Autonomo Tumori, dove fece le sue prime esperienze, collaborando per più di un anno con i professori Protti, Gusso e Neubauer dove seguì indagini di Ricerca enzimatica dei lieviti e dell'azione piroerte dei medesimi nei confronti della cellula neoplastica.

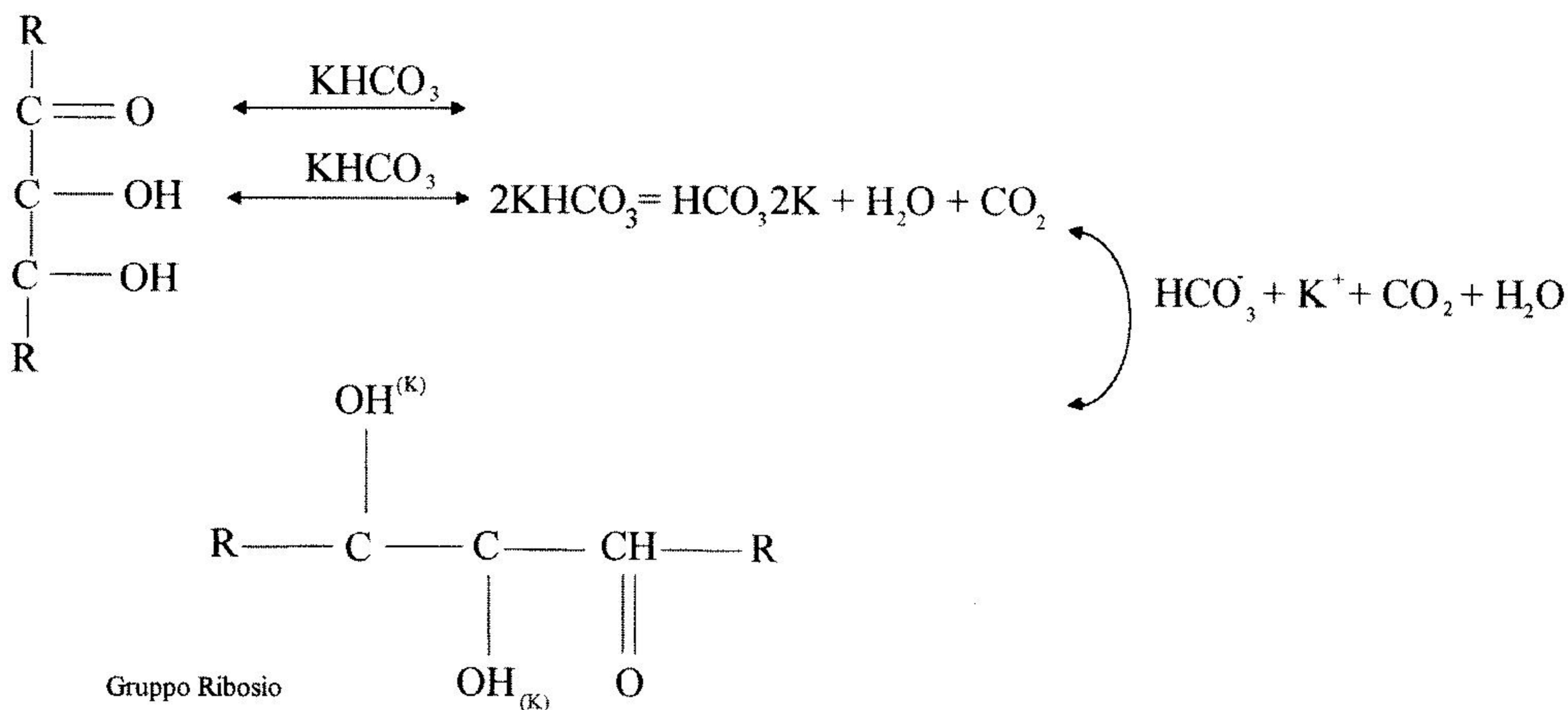
Nel 1948, ritornato a Firenze, pur occupandosi di piccole industrie farmaceutiche, in privato si dedicò alla ricerca sui tumori. Ha partecipato con comunicazioni personali ai congressi di Cancerologia di Firenze, Cremona, Baden Baden, New York, ecc. Ha fatto parte di un gruppo internazionale di ricerca sul cancro con metodiche non convenzionali, per questo è stato nominato Membro dell'Accademia delle Scienze di New York e della società Internazionale di Criochirurgia.

Per il suo contributo rivolto ad alleviare le sofferenze dei bambini di Chernobyl in seguito all'incidente alla centrale nucleare, è stato insignito dell'onoreficenza dell'Accademia delle Scienze di Mosca.

Il Dott. Valse' Pantellini e' deceduto a Vicchio del Mugello il 19 Dicembre 1999.

Formula dell'Ascorbato di Potassio legate all'azione del Ribosio

Gruppo Ascorbico



Le reazioni si svolgono liberamente in acqua



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

*Azione Protettiva dell'Ascorbato di Potassio sull'Ossidazione
dell'Emoglobina
Nei Globuli Rossi Umani*

Questa ricerca è svolta con la collaborazione della Fondazione Internazionale Valsé Pantellini per la Ricerca e lo Studio delle Malattie Degenerative di Firenze. L'azione sistemica di sostanze ossidanti, come i radicali liberi, coinvolge in molti processi degenerativi è in grado di modificare la stabilità eritrocitaria portando a perossidazione della membrana lipidica, ossidazione dell'emoglobina, ed infine alla formazione di inclusioni endoeritrocitarie denominate "corpi di Heinz".

Questo processo, che può avvenire spontaneamente, può anche essere indotto o aumentato dall'azione di un forte ossidante, quale è l'acetilfenilidrazina (APH).

Nel lavoro svolto siamo interessati all'azione antiossidante dell'ascorbato di potassio in quanto uno dei meccanismi che viene alterato in molti processi degenerativi è l'assorbimento del potassio e sembra noto che l'ascorbato di potassio possa essere utilizzato per ristabilire una concentrazione adeguata.

Un quantitativo di sangue venoso è stato incubato con APH e ascorbato di potassio sia insieme che separatamente.

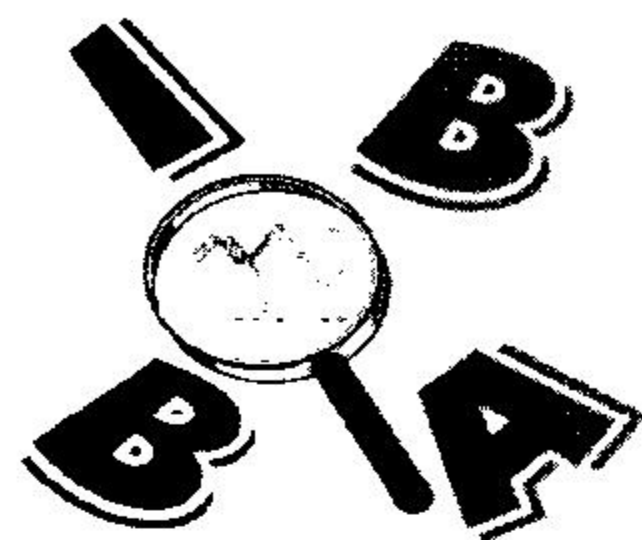
Un'analisi tramite spettroscopia Massbauer dei globuli rossi così trattati, è in grado di evidenziare lo stato di ossidazione dell'emoglobina.

I risultati ottenuti fino ad ora, hanno dimostrato chiaramente che l'ascorbato di potassio ha un'azione antiossidante a tal punto che l'ossidazione dell'emoglobina è praticamente assente.

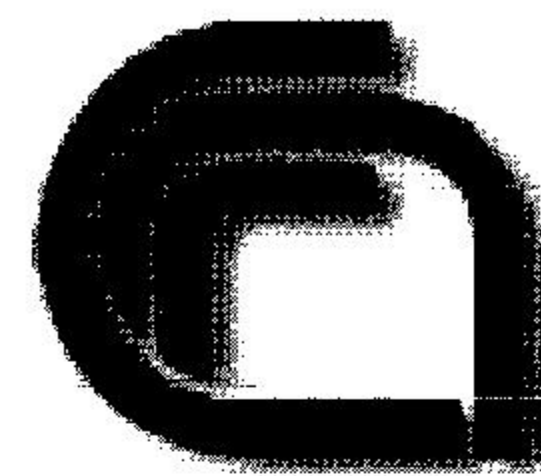
Prof.ssa Ida Ducci Ortalli
Università di Parma – Dipartimento di Sanità Pubblica
via Volturno, 39 – 43100 Parma
tel. +39 0521 903710
fax +39 0521 903713
e-mail: ducci@unipr.it



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*



Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria



La linea di ricerca che viene svolta dal reparto di mutagenesi ed ecotossicità del CNR di Pisa, diretto dal prof. Giorgio Bronzetti, ha lo scopo di valutare le proprietà antigenotossiche e, per la stretta relazione, anticancerogene dei composti in esame.

Il prof. G. Bronzetti ha una notevole esperienza in campo internazionale nella valutazione dei composti con proprietà mutagene ed anticancerogene. Al suo attivo ci sono risultati che riguardano il ruolo dei micro elementi, come le vitamine (A, C ed E), il magnesio ed il selenio.

Su questa base la Fondazione Valsé Pantellini ha interessato il CNR di Pisa per uno studio più approfondito sulle proprietà dell' ascorbato di potassio, anche nella combinazione con il ribosio, contro le patologie degenerative.

L'ascorbato di potassio è indicato come un composto con una proprietà potenzialmente anticancerogena. La Fondazione Valsé Pantellini vuole comprendere maggiormente intorno al ruolo ed alle potenzialità della molecola in oggetto. A tal proposito è stato effettuato un programma integrando le esperienze della Fondazione Pantellini, le professionalità dell'Università di Parma (Prof.ssa Ida Ducci Ortalli) e del CNR di Pisa (Prof. Giorgio Bronzetti).

Il gruppo di Pisa ha il compito di valutare gli effetti e le proprietà anticancerogene. L'Università di Parma, invece, ha il compito di studiare i meccanismi che sono alla base degli effetti.

Il gruppo del Prof. Bronzetti del C.N.R. di Pisa ha già effettuato degli studi: **dai risultati preliminari l'Ascorbato di Potassio, anche in combinazione con il Ribosio (che ne potenzia l'azione), alle concentrazioni di utilizzo non ha alcun effetto tossico e genotossico.** Inoltre, i risultati preliminari relativi alle caratteristiche antimutagene a bassissima concentrazione (10 nM !) indicano che l'ascorbato di potassio con ribosio evidenzia significativamente un comportamento antimutageno. Sono in corso le valutazioni alle concentrazioni di normale impiego (fino all'ordine delle mM). Inoltre il composto sembra promettente nel processo anticancerogeno.

Purtroppo il Prof. Bronzetti è deceduto all'inizio del 2005.

Reparto di Mutagenesi ed Ecotossicità del C.N.R.
Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria – Sezione di Pisa
(ex Istituto di Mutagenesi e Differenziamento)
Area della Ricerca – via Moruzzi, 1 - 56124 Pisa
Tel. +39 050 3152709



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

"ANTIOXIDANT IN CANCER PREVENTION AND THERAPY"

**Conferenza Internazionale Organizzata e Supportata da
International Institute of Anticancer Research
Atene, 4-7 giugno 2001**

Relazione dal titolo:

*"Potassium ascorbate as protective agent
in the oxidation of red blood cells"*

I.Ortalli, S. Croci, G. Pedrazzi - **Istituto di Scienza Fisiche, Università di Parma**
D. Monetti, G. Paoli - **Fondazione Internazionale Valsé Pantellini, Firenze**
G. Bronzetti - **Istituto di Mutagenesi e Differenziamento, C.N.R. Pisa**

**"INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE APPLICATION
OF THE MÖSSBAUER EFFECT" (ICAME)**

Organizzata da:

Institute of Physics
Oxford, 2-7 settembre 2001

Relazione presentata nell'ambito della sessione Poster dal titolo:

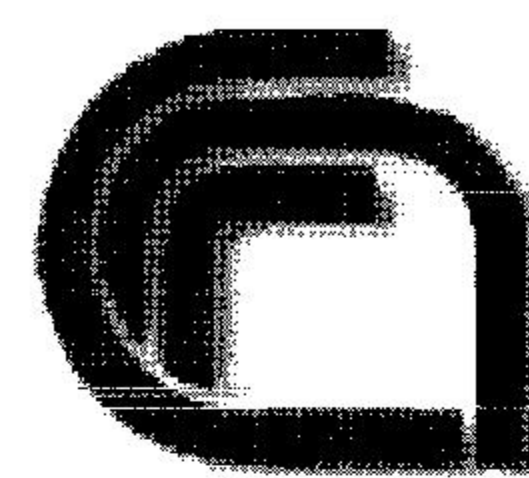
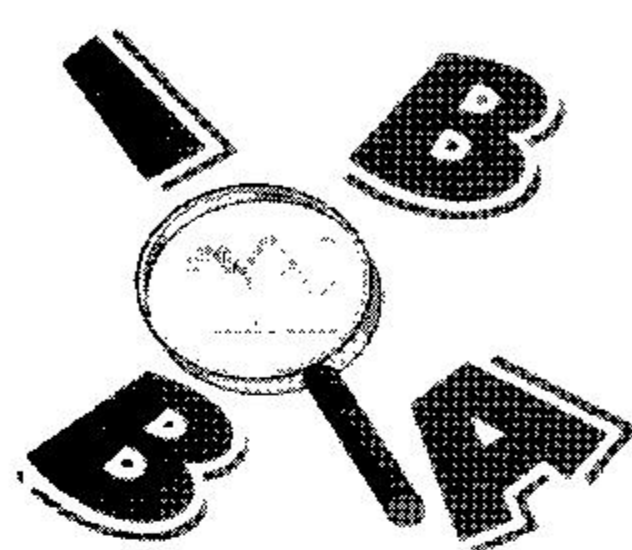
*"Potassium ascorbate as protective agent
in the oxidation of red blood cells"*

I.Ortalli, S. Croci, G. Pedrazzi - **Istituto di Scienza Fisiche, Università di Parma**
D. Monetti, G. Paoli - **Fondazione Internazionale Valsé Pantellini, Firenze**

Le relazioni hanno messo in evidenza che l'ascorbato di potassio svolge un'azione protettiva verso i globuli rossi umani quando questi sono sottoposti a stress ossidativi indotto da un agente altamente ossidante: l'APH (acetilfenilidrazina). In assenza di questo sale derivato dall'acido ascorbico, l'APH produce un danno irreversibile con pressoché totale distruzione dell'emoglobina. Queste misure sono state effettuate dal gruppo di fisici dell'Università di Parma (Prof.ssa Ida Ortalli), utilizzando la spettroscopia Mössbauer. Contemporaneamente il Reparto di Mutagenesi ed Ecotossicità del C.N.R. di Pisa (Prof. Bronzetti) ha condotto degli studi preliminari per valutare eventuali effetti tossici o genotossici del composto in esame su cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* (impiegato perché costituisce un modello genetico rapido e poco dispendioso per individuare potenziali effetti tossici delle sostanze), effetti che sono risultati completamente assenti. Inoltre, sempre a livello preliminare, l'ascorbato di potassio risulta promettente come inibitore dei processi cancerogeni e mutageni.



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*



Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria

**“EIGHTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON MECHANISMS OF
ANTIMUTAGENESIS AND ANTICARCINOGENESIS (ICMAA – VIII)”**

**Conferenza Internazionale Organizzata da
C.N.R. - Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria
Sezione di Pisa
Pisa, 4-8 Ottobre 2003**

Relazione presentata nell'ambito della sessione Poster dal titolo:

*“Protective effect of potassium ascorbate
in different strains of yeast *Saccharomyces Cerevisiae*”*

**C. Della Croce, G. Poi, L. Calvavuturo, M. Cini, G. Bronzetti - Reparto di Mutagenesi ed Ecotossicità, Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, C.N.R Pisa,
M. Badi, G. Paoli - Fondazione Internazionale Valsé Pantellini per la Ricerca e lo Studio delle Malattie Degenerative, Sede Italiana, Firenze**

Il lavoro ha messo in evidenza che l'ascorbato di potassio non mostra effetti genotossici sui lieviti *Saccharomyces Cerevisiae* (che rappresentano un modello del comportamento umano e costituisce un modello genetico rapido e poco dispendioso per individuare potenziali effetti tossici delle sostanze) nelle varie sessioni sperimentali e con concentrazioni del composto variabili fra 1 μ M e 10 mM.

Inoltre, sono stati fatti test di antimutagenesi (strettamente legati ai processi di anticancerogenesi) utilizzando come agenti ossidanti sia l'acqua ossigenata che l'APH (acetilfenilidrazina). Questi agenti sono in grado di produrre radicali liberi che portano rapidamente a danno e mutazione cellulare. Nelle diverse condizioni sperimentali, l'ascorbato di potassio, anche in presenza di ribosio, riduce significativamente la frequenza di conversione genica e di mutazione puntiforme nei ceppi di lievito e contrasta la tossicità dei due agenti ossidanti.

Il composto in esame evidenzia anche caratteristiche di protezione cellulare, in presenza di acqua ossigenata, in ceppi di lievito mutati per le SOD (SuperOssidoDismutasi), caratterizzati cioè dall'assenza di geni codificanti per questo importantissimo enzima coinvolto nella detossificazione dai radicali liberi.

In condizioni di stress ossidativo, questi dati confermano l'azione protettiva del composto su cellule di lievito *Saccharomyces Cerevisiae*.



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA



*Fondazione Internazionale
Valsè Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

"ANTIOXIDANT IN CANCER PREVENTION AND THERAPY"

**Conferenza Internazionale Organizzata e Supportata da
International Institute of Anticancer Research
Atene, 4-7 giugno 2001**

Relazione dal titolo:
*"Potassium ascorbate as protective agent
in the oxidation of red blood cells"*

I.Ortalli, S. Croci, G. Pedrazzi - **Istituto di Scienza Fisiche, Università di Parma**
D. Monetti, G. Paoli - **Fondazione Internazionale Valsè Pantellini, Firenze**
G. Bronzetti - **Istituto di Mutagenesi e Differenziamento, C.N.R. Pisa**

**"INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE APPLICATION
OF THE MÖSSBAUER EFFECT" (ICAME)**

Organizzata da:
Institute of Physics
Oxford, 2-7 settembre 2001

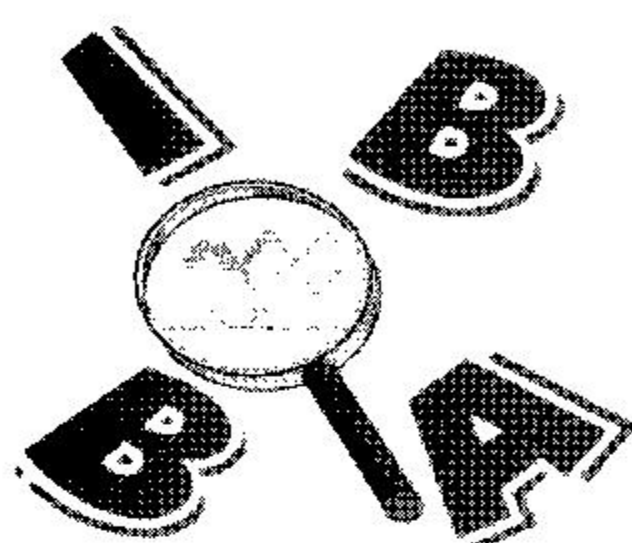
Relazione presentata nell'ambito della sessione Poster dal titolo:
*"Potassium ascorbate as protective agent
in the oxidation of red blood cells"*

I.Ortalli, S. Croci, G. Pedrazzi - **Istituto di Scienza Fisiche, Università di Parma**
D. Monetti, G. Paoli - **Fondazione Internazionale Valsè Pantellini, Firenze**

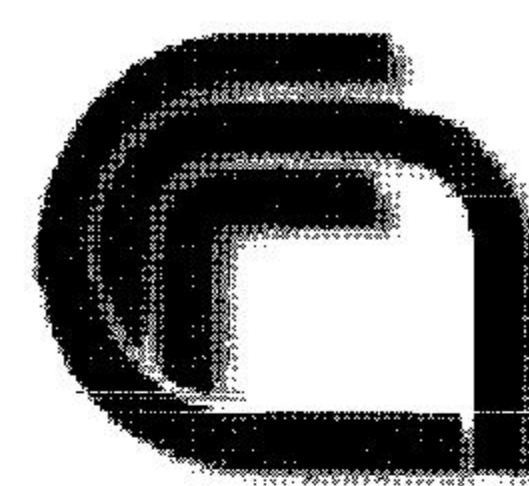
Le relazioni hanno messo in evidenza che l'ascorbato di potassio svolge un'azione protettiva verso i globuli rossi umani quando questi sono sottoposti a stress ossidativi indotto da un agente altamente ossidante: l'APH (acetilfenilidrazina). In assenza di questo sale derivato dall'acido ascorbico, l'APH produce un danno irreversibile con pressoché totale distruzione dell'emoglobina. Queste misure sono state effettuate dal gruppo di fisici dell'Università di Parma (Prof.ssa Ida Ortalli), utilizzando la spettroscopia Mössbauer. Contemporaneamente il Reparto di Mutagenesi ed Ecotossicità del C.N.R. di Pisa (Prof. Bronzetti) ha condotto degli studi preliminari per valutare eventuali effetti tossici o genotossici del composto in esame su cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* (impiegato perché costituisce un modello genetico rapido e poco dispendioso per individuare potenziali effetti tossici delle sostanze), effetti che sono risultati completamente assenti. Inoltre, sempre a livello preliminare, l'ascorbato di potassio risulta promettente come inibitore dei processi cancerogeni e mutageni.



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*



Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria



**"EIGHTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON MECHANISMS OF
ANTIMUTAGENESIS AND ANTICARCINOGENESIS (ICMAA – VIII)"**

**Conferenza Internazionale Organizzata da
C.N.R. - Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria
Sezione di Pisa
Pisa, 4-8 Ottobre 2003**

Relazione presentata nell'ambito della sessione Poster dal titolo:

*"Protective effect of potassium ascorbate
in different strains of yeast *Saccharomyces Cerevisiae*"*

**C. Della Croce, G. Poi, L. Calvavuturo, M. Cini, G. Bronzetti - Reparto di Mutagenesi ed Ecotossicità, Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, C.N.R Pisa,
M. Badi, G. Paoli - Fondazione Internazionale Valsé Pantellini per la Ricerca e lo Studio delle Malattie Degenerative, Sede Italiana, Firenze**

Il lavoro ha messo in evidenza che l'ascorbato di potassio non mostra effetti genotossici sui lieviti *Saccharomyces Cerevisiae* (che rappresentano un modello del comportamento umano e costituisce un modello genetico rapido e poco dispendioso per individuare potenziali effetti tossici delle sostanze) nelle varie sessioni sperimentali e con concentrazioni del composto variabili fra 1 μ M e 10 mM.

Inoltre, sono stati fatti test di antimutagenesi (strettamente legati ai processi di anticancerogenesi) utilizzando come agenti ossidanti sia l'acqua ossigenata che l'APH (acetilfenilidrazina). Questi agenti sono in grado di produrre radicali liberi che portano rapidamente a danno e mutazione cellulare. Nelle diverse condizioni sperimentali, l'ascorbato di potassio, anche in presenza di ribosio, riduce significativamente la frequenza di conversione genica e di mutazione puntiforme nei ceppi di lievito e contrasta la tossicità dei due agenti ossidanti.

Il composto in esame evidenzia anche caratteristiche di protezione cellulare, in presenza di acqua ossigenata, in ceppi di lievito mutati per le SOD (SuperOssidoDismutasi), caratterizzati cioè dall'assenza di geni codificanti per questo importantissimo enzima coinvolto nella detossificazione dai radicali liberi.

In condizioni di stress ossidativo, questi dati confermano l'azione protettiva del composto su cellule di lievito *Saccharomyces Cerevisiae*.



*Fondazione Internazionale
Valsè Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

Fondazione Internazionale Valsé Pantellini
delegazione italiana

Valsé Pantellini International Foundation
Head Quarter

Fundacion Valsé Pantellini
Spagna

Convegno di Studi

**OLTRE L'ASCORBATO
DI POTASSIO:
viaggio intorno al “*problema cancro*”**

28 maggio 2005
Teatro della Compagnia
via Cavour, 50/r – FIRENZE

*Con il patrocinio di:
Provincia di Firenze e Comune di Firenze*

Meccanismi protettivi dell'ascorbato di potassio nei processi ossidativi dell'emoglobina umana. Presupposti per un progetto di ricerca in patologie neoplastiche "in vitro" nei cani.

Prof. Ida Ortalli – Direttore Dipartimento Sanità Pubblica

Dr. Simonetta Croci – Dipartimento Sanità Pubblica

Prof. Maurizio Dondi – Dipartimento di Salute Animale

Università degli Studi di Parma

Esistono evidenze secondo cui la malattia tumorale ed altre patologie degenerative, a causa di un intervento patogeno a carattere sistemico, determinano nei globuli rossi una diminuzione del loro potere di difesa di fronte all'azione di composti tossici.

Nelle patogenesi della malattia tumorale un ruolo importante è svolto dai radicali liberi che, possedendo attività perossidativa possono penetrare nelle cellule. I radicali liberi determinano anche stress ossidativo dell'ossiemoglobina (Hb) con conseguente produzione di metemoglobina (MetHb) ed emicromi, precursori dei corpi di Heinz. Vi sono stretti rapporti fra denaturazione dell'Hb ed alterazione della membrana eritrocitaria: lo stress ossidativo dell'ossiemoglobina si accompagna ad un incremento della rigidità della membrana eritrocitaria e alla sua lipoperossidazione.

La diminuita integrità del globulo rosso e la compromissione della membrana cellulare è stata studiata con il metodo chiamato dei "Corpi di Heinz" (CdH), che sottopone in vitro il sangue di donatori ad una dose standard di un forte ossidante, l'acetilfenilidrazina (APH). La denaturazione in seguito all'azione di APH cambia lo stato di ossidazione e la configurazione dell'atomo di ferro contenuto nel gruppo eme.

In questi anni è stato analizzato, tramite spettroscopia Mössbauer, il comportamento degli eritrociti sottoposti all'azione di APH, seguendo così la formazione degli emicromi, precursori dei corpi di Heinz. I campioni analizzati sono stati prelevati da donatori sani e da pazienti con vari tipi di neoplasie. Le differenze tra i prodotti di ossidazione della Hb e la diversa concentrazione di questi prodotti sono stati evidenziati seguendo la trasformazione dinamica degli stati ossidativi del ferro da Fe(2+) a Fe(3+).

E' stato da noi individuato un tempo caratteristico di incubazione pari a 50 minuti in cui la componente emica è già presente nei campioni dei soggetti con neoplasia e non in quelli sani, indice di un maggiore stato di ossidazione (*Croci S. et al.: Acetylphenylhydrazine induced haemoglobin oxidation in erythrocytes studies by Mössbauer spectroscopy. Biochem Biophys Acta : 99-104, 2001*). Abbiamo quindi standardizzato la procedura per stabilire un "range" di normalità dello stato di ossidazione, analizzando i campioni raccolti da soggetti sani. E' stato mostrato, un uguale stato di ossidazione dopo 50 minuti d'incubazione mentre dopo 120 minuti l'ossidazione era diversa per ogni soggetto (*Croci S. et al., Red cell Hb oxidation of healthy subjects compared to breast cancer patients. Anticancer Res 22:2903-2906, 2002*). Si è scelto quindi il tempo di 50 minuti d'incubazione come tempo per la standardizzazione dell'analisi.

Lo studio è stato rivolto alle proprietà dell'ascorbato di potassio come agente antiossidante sui globuli rossi. Gli eritrociti sono infatti un sistema cellulare relativamente semplice su cui indagare l'effetto dell'ascorbato di potassio, composto che sembra esibire un'azione antitumorale.

In questo studio campioni di sangue di volontari sani, sono stati incubati con APH e ascorbato di potassio e analizzati con spettroscopia Mössbauer. In particolare vengono presentate le misure su campioni nei quali l'ascorbato di potassio e APH agiscono sia insieme che separatamente.

Emerge chiaramente dalle misure, che l'ossidazione dell'emoglobina è quasi assente quando l'ascorbato di potassio agisce insieme con APH. Questo dimostra come tale agente abbia una forte azione antiossidante unitamente alla possibile capacità di trasportare il potassio all'interno della cellula ristabilendo il normale equilibrio ionico. Infatti lo stress ossidativo provoca, a livello cellulare, uno sbilanciamento nelle concentrazioni dei cationi K^+ ed Na^+ , con conseguente alterazione della pompa Na/K, rappresentando la premessa per l'inizio di processi degenerativi. In condizioni di normalità l'ossidazione dell'emoglobina è controllata da processi enzimatici che coinvolgono GSH (glutanione ridotto) GSSG (glutanione ossidato) e il ciclo del NADPH (nicotinadeninucleotide fosfato ridotto) in cui l'acido ascorbico può fornire l'ossidazione diretta di NADPH ed essere in tal modo direttamente coinvolto.

Lo studio fin qui effettuato ha evidenziato l'azione antiossidante sull'emoglobina per cui si intende analizzare il ruolo svolto sia dall'acido ascorbico che dal potassio.

Si aggiunge inoltre l'interesse verso ribosato di potassio, che pare svolga un'azione simile e complementare a quella dell'ascorbato di potassio. E' quindi importante capire il reale ruolo di queste molecole e dei loro singoli componenti. Proseguiamo questa ricerca utilizzando il ribosato di potassio similmente a quanto fatto per l'ascorbato sui globuli rossi. Inoltre verrà estesa allo studio dell'azione che il ribosato e l'ascorbato di potassio hanno sulla crescita in vitro di alcune linee cellulari di carcinoma mammario canino.

Il ribosio infatti potrebbe essere un utile elemento nella sintesi nucleotidica. Lo studio in vitro è necessario per analizzare l'azione dei composti in modo indipendente dal metabolismo dell'animale stesso. Nel progetto di questa ricerca compare infine la forte intenzione di proseguire con una sperimentazione in vivo su animali e in particolare su femmine di cane affette da tumori mammari.

La visualizzazione dei radicali liberi e l'importanza della fibrina nel "problema cancro"

Dr. Carla Innocenti – Presidente Istituto Tedesco di Ossidologia Visualizzata

La Prevenzione acquista un ruolo sempre più importante nell'ambito della Sanità; I pazienti stessi cercano nuove possibilità terapeutiche e desiderano interventi di natura preventiva.

Un'innovazione nell'ambito della medicina preventiva è l'Ossidologia Visuale, scienza innovativa che l'Istituto Tedesco di Ossidologia Visuale ha il piacere di proporre in Europa abbinata al Sistema a Proiezione Variabile (VPS-Brevetto Europeo), che consente di eseguire il "Test Trifasico del sangue".

Il Test Trifasico è un esame microscopico che permette di individuare patologie in uno stadio iniziale NON ancora evidenziabili nelle normali analisi del sangue, offrendo grandi possibilità in termini di prevenzione e trattamento precoce.

Il cancro è un problema metabolico sia nella forma maligna che in quella benigna. Migliaia di prelievi fatti su pazienti tumorali mostrano alterazioni morfologiche nel sangue periferico coagulato. Queste manifestazioni coagulative si possono osservare in maniera minore anche negli stati precancerosi ovvero quando il tumore è completamente guaribile.

Una delle possibilità per identificare probabili stati tumorali e precancerosi, nonché vari disturbi organici non ancora evidenziabili nelle analisi del sangue è quindi l'analisi microscopica del sangue periferico.

La ricerca deve comunque continuare sulla base biologica dataci dalla materia vivente.

A Proposed Study on the Effects of Radiation
on the cytoplasm and nuclei of *Xenopus* oocytes

Prof.M.T. Camilleri Podesta
University of Malta

Radiation can be of 2 forms-: ionizing and non ionizing. Radiation cause direct destructive effects that cause cell death or mutations, or genetic defects. On the other hand, radiotherapy can be used to kill cancer cells.

Another way to treat cancer and destroy cancer cells is by chemotherapy.

Irreversible cell damage produced by either radiotherapy or chemotherapy can result in either necrosis, if the injury is acute, or in programmed cell death called apoptosis. This occurs by the activation of a whole family of proteases called caspases which break down the proteins inside the cell and which are activated by the liberation from the mitochondria of Cytochrome C which acts as a caspase activator.

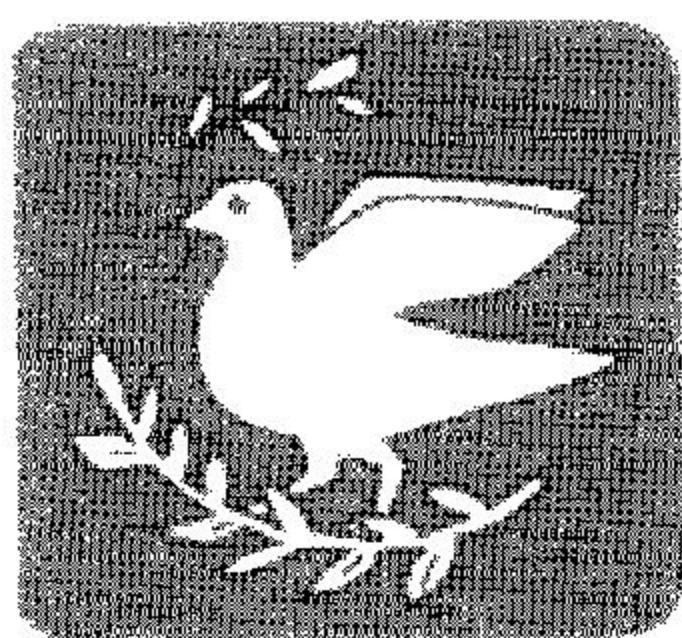
Cell damage by either means can be demonstrated in a number of ways:

1. Morphological studies – light microscopy, PAP staining, fluorescent staining with Quinacrine dihydrochloride and fluorescent staining staining with Annexin V-FITC and Propidium Iodide.
2. Flow Cytometry using Propidium Iodide stain
3. Assay for DNA Fragmentation.

Over the past years, we have studied 3 natural compounds which have been shown to have an apoptotic effect. These include Maltese Propolis, *Ricinus communis* and *Tetralinis articulata*.

Xenopus laevis, has been widely used in research as a laboratory animal. The fact that its oocytes are very large makes it suitable for research in cell biology and microinjection into the cytoplasm can be carried out with relative ease.

It is being proposed to assess the damage caused to *Xenopus* oocytes by irradiation with different doses of gamma rays and to look at the cellular mechanisms by which this damage is occurring. The proposed studies would be carried out on whole oocytes, and on the nuclei and cytoplasm separately.



**AZIENDA
OSPEDALIERA
DELLA
PROVINCIA
DI LODI**

Direzione Generale

26900 Lodi - piazza Ospitale n. 10

Tel. +39 0371-37.6400

Fax +39 0371-37.6455

direzione.generale@ao.lodi.it

LA MEDICINA QUANTISTICA: INDIRIZZI GENERALI

Prof. Piergiorgio Spaggiari - Direttore Generale Azienda Ospedaliera di Lodi - Regione Lombardia

La medicina quantistica si basa su un presupposto della teoria della relatività di Einstein, della ricerca sui biofotoni di Popp fino al rapporto quantitativo tra nucleoni e fotoni del premio Nobel Rubbia.

Si sfata così l'opinione diffusa che la dinamica biologica sia interamente dominata da meccanismi chimici, da eventi molecolari che si susseguono in modo ordinato nel tempo e nello spazio.

Sono stati messi in evidenza codici di riconoscimento tra le biomolecole (di cui il primo è stato il codice di riconoscimento tra basi del DNA e amminoacidi) che mostrano come nella materia vivente le molecole non interagiscono a caso, ma secondo pattern ben definiti.

Ci si chiede quale possa essere il meccanismo fisico a lunga distanza tra le molecole, attraverso il quale partendo da distanze dell'ordine di decine di Angstrom (1 Angstrom = 1 centomillesimo di centimetro) le molecole giungano a colpo sicuro, senza mai sbagliare indirizzo, nel luogo giusto al momento giusto per l'incontro ravvicinato di tipo chimico.

Nell'ambito dei concetti noti della fisica, l'unico candidato per questo ruolo appare essere il campo elettromagnetico, che è capace sia di interagire con le molecole, sia di operare a grandi distanze.

Studi recenti hanno mostrato che il campo elettromagnetico gioca un ruolo essenziale nell'assicurare la coesione della materia liquida e solida.

L'esistenza dei codici di riconoscimento tra molecole implica perciò l'esistenza di un livello elettromagnetico della materia vivente che dialoga con il livello chimico, assicurando che il traffico delle molecole sia ben ordinato.

Stando in questo ordine di idee, la patologia che appare in prima istanza come una anomalia molecolare del corpo, rimanda in seconda istanza a un disturbo nella rete elettromagnetica di controllo del traffico molecolare.

Perciò è possibile assumere due attitudini terapeutiche:

1. intervenire direttamente sul livello chimico dell'organismo, fornendo sostanze chimiche atte a rimuovere l'anomalia manifestata nella struttura molecolare;
2. intervenire sul livello elettromagnetico rimuovendo il disturbo che sconvolge il traffico molecolare.

Mentre la medicina ufficiale sposta la prima attitudine, le varie medicine complementari, consapevolmente o inconsapevolmente, si legano alla seconda.

Questo intervento sul livello elettromagnetico può avvenire sia applicando direttamente dall'esterno campi elettromagnetici (come nelle magnetoterapie, nell'agopuntura, nelle terapie Bicom, Segez, e così via), sia intervenendo in maniera da alterare in modo indiretto la struttura dei segnali elettromagnetici.

Materia, quindi, con solide basi scientifiche che può, secondo noi, a pieno titolo transitare con tutto rispetto nella medicina ufficiale e nella scienza.

A questo punto è bene ricordare il vecchio detto: "Nihil sub sole novi".

A ben guardare i principi della relatività della materia-energia, che sono alla base di queste nuove esperienze terapeutiche, si ritrovano intuiti e descritti nelle diverse dottrine orientali dal buddismo al gianismo che trattando di energie e di scambio di energie recitano: "Nulla esiste nell'universo che non sia nel corpo umano, nulla esiste nel corpo umano che non sia nell'universo".

Risultato di uno studio osservazionale su un gruppo di anziani con polipatologie croniche condotto presso la Casa Protetta "Il Corniolo"

Dr. Angelo Masi - Medico Responsabile Casa Protetta "Il Corniolo" - Baricella (Bo)

- 1) La Casa Protetta il Corniolo è una struttura socio-sanitaria che cerca di coniugare il calore e l'accoglienza di una Casa con la necessità di assistenza sanitaria a persone affette da numerose e gravi patologie.
- 2) La Fondazione Pantellini, nata nel 1998 per onorare la figura del Dott. Gianfrancesco Valsé Pantellini e continuarne gli studi, ha interesse ad approfondire e sviluppare le problematiche di primaria importanza relative alla salute dell'Uomo.
- 3) L'Ascorbato di Potassio con Ribosio è un sale derivato dalla Vitamina C che ha la caratteristica di regolarizzare le funzioni fisiologiche e potenziare le risposte immunitarie.

L'OBIETTIVO è stato quello di misurare gli effetti della somministrazione di Ascorbato di Potassio con Ribosio su alcuni parametri (clinici e biologici) e sulle condizioni di salute in un gruppo di anziani con polipatologie croniche, al fine del recupero e/o mantenimento delle autonomie residue.

Si è ritenuto che il tempo congruo per tale valutazione fosse di sei mesi e che fosse opportuno disporre di due gruppi: uno trattato ed uno di controllo.

La Fondazione Pantellini, avendo, tra gli altri, l'obiettivo statutario di "promuovere, coordinare e curare direttamente o indirettamente ricerche sperimentali e cliniche", si è assunta l'impegno di fornire gratuitamente l'Ascorbato di Potassio con Ribosio necessario per questo Progetto di ricerca; e inoltre ha fornito consulenza scientifica per tutta la durata della ricerca, in particolare per la selezione del campione da trattare e del gruppo di controllo, per la valutazione dei risultati e per le conclusioni/ indicazioni della ricerca.

La METODOLOGIA del lavoro è stata la seguente:

- incontro con gli Ospiti ed i Parenti per illustrare il Progetto ai fini del Consenso
- scelta e definizione dei criteri di misura degli Indicatori
- scelta, con criteri clinici volti a ridurre al minimo problemi ed interferenze con le condizioni di vita e salute degli Ospiti, del gruppo da trattare e di controllo (il criterio indicato dagli Esperti della Fondazione Pantellini è stato che dal gruppo trattato fossero esclusi gli Ospiti con ictus cerebrale e quelli affetti da patologie psichiatriche in trattamento con psicofarmaci)
- somministrazione dell'Ascorbato di Potassio con Ribosio (1 bustina di Acido Ascorbico con Ribosio ed 1 bustina di Potassio Bicarbonato da sciogliere in 20 cc di acqua minerale, mescolando con cucchiaino di plastica, da assumere 30 minuti circa prima di mangiare)
- rilevazione dei parametri concordati e verifica continua delle condizioni di salute del gruppo trattato e del gruppo di controllo(gli indicatori scelti per la valutazione sono: Pressione Arteriosa, Frequenza cardiaca, Peso corporeo, Saturazione percentuale di O₂ nel sangue, Glicemia a digiuno, pH urinario al mattino, Emocromo completo con formula leucocitaria, VES, PCR, Sodio, Potassio, Calcio, Magnesio e Fibrinogeno plasmatici
- confronto dei dati misurati (prima, durante e dopo la somministrazione del prodotto) tra i due gruppi e nei singoli Pazienti (i tempi stabiliti sono di una verifica a 3 mesi ed una a 6 mesi)
- riflessione sui dati rilevati e indicazioni/conclusioni in relazione alle condizioni di salute (intesa come stato di benessere globale).

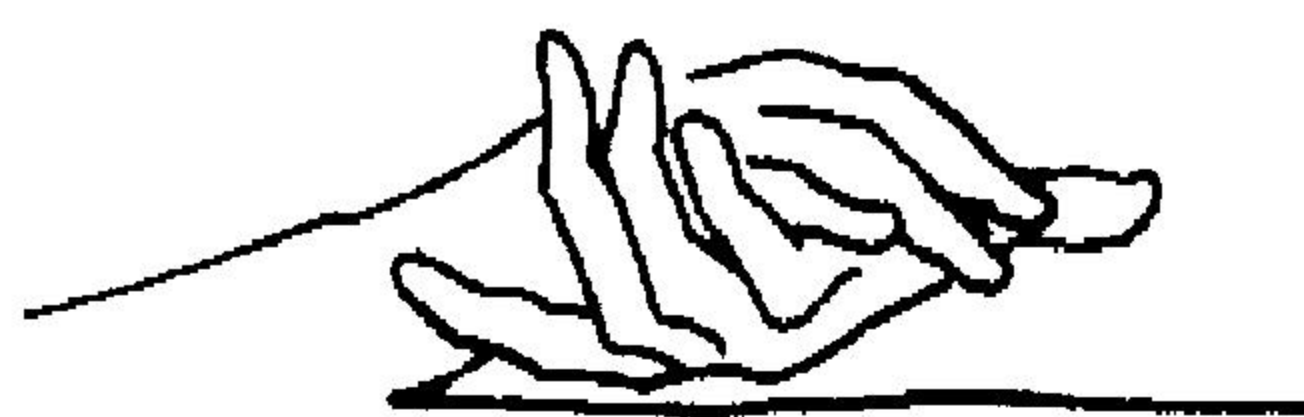
Genetica, bio-informazione, complessità: un altro punto di vista.

Dr. Paoli Guido – Responsabile Scientifico Fondazione Pantellini

L'approccio attuale della ricerca in campo biomedico tende a privilegiare il filone della genomica e della proteomica, nella convinzione che questa sia la strada per trovare la chiave che sconfigga patologie degenerative aggressive e spesso infauste come il cancro, la sclerosi nelle sue varie forme, le malattie di origine autoimmune. Il funzionamento della materia vivente viene prevalentemente indagato seguendo il metodo analitico, che ricostruisce il funzionamento di un dato sistema attraverso l'analisi sequenziale di interazione di singole molecole. Una visione completamente diversa emerge se si segue il cosiddetto metodo sintetico, che guarda le proprietà collettive della materia. Infatti, i sistemi biologici non sono semplicemente "pezzi" di materia da assemblare ma, diversamente da questi, sono *sistemi aperti* potendo scambiare *informazioni* con l'ambiente circostante sotto forma di energia e materia ed attraverso processi dinamici. Inoltre, tutti questi processi avvengono in soluzione acquosa che evidenzia forme di aggregazione straordinariamente sorprendenti introducendo fenomeni di cooperatività e coerenza per orientare nel modo migliore il flusso di informazioni. In questo senso, le patologie possono essere viste come difetti di comunicazione cellulare e l'analisi delle interazioni che avvengono soprattutto a lunga distanza (su scala inter-cellulare) coinvolge un livello di indagine di tipo fisico legato all'elettrodinamica quantistica, all'analisi dei sistemi dinamici, allo studio di strutture dissipative (termodinamica del non-equilibrio). Lo stesso studio delle strutture terziarie e quaternarie di proteine ed enzimi sembra condurre verso molecole assai complesse ma rigide, stabili, ma se potessimo vedere le stesse molecole in un processo dinamico ci accorgeremmo chiaramente che la forma degli enzimi e delle proteine può cambiare momento dopo momento poiché seguono i cambiamenti localmente indotti da variazioni di tipo fisico e chimico, in definitiva per la loro "capacità di leggere" quanto avviene intorno a loro e quindi di scambiare informazioni con l'ambiente circostante.

L'indagine di patologie degenerative come il cancro segue la linea genetica, come danno indotto dall'accumulo di mutazioni in classi specifiche di geni del DNA (gli oncogeni). A causa di questo, le informazioni che dal DNA sono indirizzate alle "officine cellulari" per la costruzione di specifiche proteine od enzimi sono errate. Così le sostanze prodotte avranno un comportamento anomalo od addirittura potranno anche non essere utilizzate poiché incomplete.

Per una corretta comprensione dei meccanismi degenerativi, diventa decisivo dare risposta alla domanda: la mutazione genetica che provoca la degenerazione cellulare avviene per un danno diretto sul DNA oppure è una conseguenza di processi che avvengono nella "periferia" della cellula (nel citoplasma) e che vengono "letti" dal DNA come una spinta alla mutazione per "adeguarsi" ad un ambiente che sta cambiando? In sostanza, la mutazione genetica è la causa o l'effetto della degenerazione cellulare? La risposta a questa domanda potrebbe veramente aprire scenari completamente nuovi nella comprensione dei meccanismi di innesco (cioè la causa) di una neoplasia e negli studi stessi sul genoma, coinvolgendo a pieno titolo i processi di comunicazione cellulare ed i meccanismi di scambio di informazioni. Infatti, lo stesso impiego di ascorbato di potassio e ribosio, al di là dei risultati ottenuti in quasi sessant'anni di attività di ricerca, trovano la loro giustificazione profonda nell'ipotesi che il "*problema cancro*" nasca da un difetto di informazione provocato da squilibri locali che avvengono a livello della membrana cellulare. L'azione di questa molecola, totalmente atossica e priva di effetti collaterali, da una parte mantiene le corrette concentrazioni elettrolitiche nelle cellule "sane", mentre cerca di creare un ambiente "ostile" alle cellule neoplastiche perché è in grado di limitare ed anche esaurire le loro risorse energetiche in quanto favorisce l'eliminazione di glucosio di cui le cellule tumorali sono ricche. È dal lavoro congiunto di competenze diverse che possiamo veramente intravedere una possibile strada che ci permetta di fare davvero luce su questioni così decisive per la salute umana.



*Fondazione Internazionale
Valsè Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

Convegno di studio

ASCORBATO DI POTASSIO
*Sperimentazioni e prospettive terapeutiche
nelle patologie degenerative*

ABSTRACT DELLE RELAZIONI

Sabato 21 Ottobre 2000
**Auditorium del Consiglio Regionale della Toscana
Firenze**

**Alla presenza del Dott. Umberto Filibeck, Dipartimento di Farmacovigilanza
del Ministero della Sanità, delegato dal Ministro Prof. Umberto Veronesi.**

*Con il patrocinio di:
Regione Toscana, Provincia di Firenze, Comune di Firenze,
Prefettura di Firenze*



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

Dott. Guido Paoli

Fisico, dottore di ricerca, Responsabile Scientifico della Fondazione Internazionale Valsé Pantellini per la Ricerca e lo Studio delle Malattie Degenerative.

Membro della Società Italiana di Fisica (S.I.F.)

Il ruolo dell'ascorbato di potassio contro le patologie degenerative

L'interesse per l'ascorbato di potassio (sale derivato dall'acido ascorbico), fortissimo agente antiossidante, è legato agli straordinari effetti evidenziati dal composto contro le degenerazioni cellulari e particolarmente contro le neoplasie.

La sua azione, oltre ad essere protettiva per la cellula in quanto antiossidante, è legata al ripristino del corretto equilibrio di potassio citoplasmatico, la cui concentrazione viene drasticamente alterata dall'evoluzione della patologia degenerativa. Poiché il potassio gioca un ruolo decisivo nella regolazione dell'attività metabolica cellulare, la sua perdita citoplasmatica con fuoriuscita attraverso la membrana oltre ad essere legata ad un significativo sbilanciamento elettrolitico, ha un peso decisivo nella proliferazione incontrollata delle cellule degenerate.

Il potassio, per esplicitare la sua azione, si lega agli anelli pirrolici degli enzimi e delle proteine e salifica i gruppi NH ed NH₂ delle stesse. La sua perdita è presumibilmente legata (ipotesi di lavoro) all'apertura degli anelli pirrolici ed alla modificazione dell'ambiente acido-base (la salificazione del potassio avviene normalmente in ambiente leggermente acido). La fuoriuscita di K⁺ induce l'immissione di sodio con conseguente sbilanciamento dell'ATP-asi sodio-potassio e di tutto l'equilibrio elettrolitico. Si deve rilevare l'impossibilità di reintegrare il potassio citoplasmatico attraverso la somministrazione di KCl, citrato di K, tartarato di K od altro mentre questo risulta possibile solo attraverso la somministrazione di ascorbato di potassio.

L'acido ascorbico ha una struttura furanosica del tutto equivalente a quella degli anelli pirrolici (presenti anche nelle proteine di membrana) e la sua azione è quella di "carrier" per il potassio a livello intracellulare.

Nell'esperienza della Fondazione (e soprattutto in quella del Dott. Pantellini) questi fatti producono un arresto del processo di proliferazione incontrollata, un riequilibrio degli elettroliti con ripristino del corretto metabolismo cellulare ed un'inversione di tendenza nel processo degenerativo cellulare.



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

Prof.ssa Ida Ortalli

Direttore dell'Istituto di Scienze Fisiche e cattedra di Fisica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Parma.

Membro della Società Italiana di Fisica (S.I.F.) e per 12 anni eletta nel Consiglio Direttivo della stessa.

Inserita nelle Commissioni e nei Comitati a livello Nazionale e NATO per l'assegnazione di fondi e per le valutazioni dei progetti di ricerca.

**Azione protettiva dell'ascorbato di potassio sull'ossidazione
dell'emoglobina in globuli rossi umani**

L'azione sistemica di sostanze ossidanti coinvolte in molte malattie degenerative è in grado di modificare la stabilità eritrocitaria portando a perossidazione della membrana lipidica, ossidazione dell'emoglobina ed infine alla formazione di inclusioni eritrocitarie denominate "corpi di Heinz". Un tale processo può anche essere indotto od amplificato dall'azione di forti ossidanti come, ad esempio, l'acetilfenilidrazina (APH).

In un precedente lavoro abbiamo analizzato in eritrociti umani, la formazione di corpi di Heinz indotti dall'azione di APH. Poiché uno dei meccanismi che viene alterato in molti processi degenerativi è l'assorbimento del potassio e, sembra noto, che l'ascorbato di potassio possa essere utilizzato per ristabilire una concentrazione adeguata, nel presente lavoro sono state esaminate le proprietà protettive dell'ascorbato di potassio su globuli rossi trattati con l'APH.

L'ascorbato di potassio è stato somministrato in diverse modalità, sia insieme all'APH sia separatamente. Il processo ossidativo dell'emoglobina è stato seguito con spettroscopia Mössbauer.

I risultati ottenuti mostrano che la presenza di ascorbato di potassio riduce sensibilmente l'ossidazione dell'emoglobina.



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

Dott. Carlo Bigliocca

*Medico Chirurgo, Specialista in Igiene, Medicina Preventiva e Sanità Pubblica
Gattinara (Vc)*

**"15 mesi di sperimentazione clinica con ascorbato di potassio e ribosio in
pazienti oncologici".**

Questo lavoro prende in considerazione 16 pazienti con patologie neoplastiche, 9 donne e 7 uomini con un'età compresa fra i 51 e gli 80 anni con un periodo di osservazione massimo fra il Marzo 1999 ed il Settembre 2000.

I tumori valutati sono stati:

- 6 mammari
- 3 pancreatici
- 3 gastrointestinali
- 2 polmonari
- 1 epatico
- 1 vescicale

Dei 6 tumori mammari, solo una donna fece la chemioterapia mentre le altre, per vari motivi, la rifiutarono. Queste 5 persone non avevano metastasi. Il tamoxifene venne somministrato a tutte le pazienti. Durante il periodo di osservazione non comparvero metastasi.

Dei 3 tumori pancreatici, uno era inoperabile, uno fu operato con successo e la terza persona rifiutò l'operazione. I pazienti sono vivi.

Dei 3 tumori gastrointestinali, uno era un tumore gastrico inoperabile, mentre gli altri due erano colon-rettali e furono operati anche se uno aveva già metastasi diffuse. Due di questi pazienti sono deceduti.

I 2 tumori polmonari erano inoperabili. Un paziente è deceduto.

Il tumore epatico e quello vescicale erano inoperabili. I pazienti sono vivi.

La terapia applicata su tutti questi pazienti è stata di tre dosi di ascorbato di potassio con ribosio secondo il protocollo del Dott. Valsé Pantellini. In alcuni pazienti, come terapia di supporto, sono state praticate fleboclisi secondo il protocollo Valsé Pantellini contenenti:

- Vitamina C
- Toxepasi
- TAD
- Milid
- Bentelan



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

Prof. Giorgio Bronzetti

Responsabile del Reparto di Mutagenesi ed Ecotossicità dell'Istituto di Mutagenesi e Differenziamento del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pisa.

Metodologia sperimentale su sostanze anticancerogene. Possibili applicazioni dell'ascorbato di potassio

Le recenti statistiche mettono in evidenza un aumento dei tumori e se valutiamo i risultati delle indagini epidemiologiche notiamo che la maggior incidenza è determinata dalla mortalità del cancro ai polmoni ed al colon. A questi seguono altri come il cancro al petto sottolineando inoltre che si ha un incremento per quanto riguarda il tumore alla prostata. Altro aspetto allarmante è costituito dalla neoplasia al cervello che colpisce soprattutto le fasce in età giovanile. E' evidente che i due principali fattori responsabili dello sviluppo delle neoplasie, in base ai reports di differenti agenzie, sono la contaminazione e l'alimentazione. Contaminazione che è riferita in senso generale a quella disposizione in ambienti di lavoro. Per quanto riguarda l'alimentazione, essa è imputata come la maggiore responsabile (dal 30 al 50% dei tumori), molto più del fumo di tabacco e ambienti professionali. Ma al di là di questo aspetto, benché siano stati fatti molti progressi nella spiegazione dei meccanismi che stanno alla base dell'evento tumorale, ancora non sono ben chiariti tutti gli aspetti. Un contributo in questa direzione viene dalle recenti acquisizioni della biologia molecolare mettendo in evidenza la stretta relazione tra mutazione e sviluppo di neoplasma. Ormai è chiaro che un'alterazione al livello del DNA, più o meno estesa, può dare sviluppo ad un evento tumorale. La progressione della neoplasia può essere bloccata se intervengono processi di riparo al livello del DNA che restaura la molecola che contiene il materiale ereditario, non permettendo la progressione tumorale. Altro importante aspetto è costituito dall'anti-promotore che può avere la capacità di bloccare la promozione dello sviluppo nella cancerogenesi. Se non intervengono gli antipromotori, se non è effettuata la riparazione del DNA, oppure se essa è attivata in maniera sbagliata, allora abbiamo la progressione tumorale fino alla fase clinica. Ormai è chiaro che esistono degli anti-promotori come componenti del Selenio, clorofillina, Vitamina A, B, E ecc. A questi ce ne sono altri di cui non si conoscono le potenzialità anticancerogene, come per esempio potrebbe essere l'ascorbato di potassio. Ma com'è possibile determinare le potenzialità anticancerogene? I sistemi a breve termine di antimutagenesi, meglio definiti di antigenotossicità, offrono un valido terreno per gli studi in questa direzione. Attualmente i sistemi di antigenotossicità, che si presentano con una relativa facilità operativa, economicità, ripetibilità, costituiscono uno dei mezzi più validi nella determinazione delle proprietà anticancerogene dei composti. Presso il nostro reparto tali sistemi sono stati utilizzati per "scoprire" alcuni composti che attualmente sono guardati con attenzione per un intervento chemiopreventivo.

THE BIOMAGNETIC NATURE OF CANCER AND THE ROLE OF POTASSIUM ASCORBATE AND RIBOSE AGAINST CELLULAR DEGENERATION

Guido Paoli

Valsé Pantellini International Foundation for Research and Studies on Degenerative Diseases
Via Mattioli 55. 50139 Florence, Italy. e-mail: fondazione@pantellini.org

ABSTRACT

Free radicals are the main cause of cell oxidative stress, and can induce cell degeneration, DNA mutation, and carcinogenesis. A free radical is a paramagnetic cation because it is an atom or molecule with uncompensated magnetic moment. Due to this, the magnetic fields generated by free radicals can play a crucial role in influencing the direction and the course of redox chemical reactions. According to our data, we think that, at the cellular level, the first step of the oxidative stress is the damage to the Na/K pump, and this can induce an electrolytic imbalance with a potassium efflux from the cytoplasm. This fact is so dramatic for the cell that a chain of events can start that leads to a process of degeneration. Indeed, some works about the activation of apoptosis have put in evidence that potassium plays a primary role as the main regulator of cellular metabolism.

Potassium ascorbate (a vitamin C-derived salt) and ribose can quickly transfer K to the intracellular level and balance its concentration, working on the heterocyclic groups of proteins and enzymes like pyrrolic and furanoid rings. Our data confirms that this compound is also effective to protect cells from oxidative stress, and it shows an anti-mutagen behavior.

INTRODUCTION

Oxidative processes are involved in promoting and developing cancer [1-3]. The main cause of oxidative stress is free radicals. These are one-unpaired-electron molecular fragments created by the unimolecular dissociation of excited states and of radical ions. Free radicals are paramagnetic substances; they continuously develop in living organisms and continuously enter into reactions producing definite compounds. Their basic properties are high chemical reactivity as well as a relatively short lifetime when in the free state.

A living organism tends to maintain constant the free radical concentration just to guarantee normal biological processes. From the magnetic point of view, their uncompensated spins must be counted because their high reactivity is connected with their paramagnetic properties.

The main causes underlying the development of free radicals from magnetically neutral molecules are:

- external energy absorption;
- induction of a molecular decomposing reaction;
- induction of an electron transfer reaction.

It should be noted that even the magnetic field generated by a nuclear magnetic moment can modify chemical reactions, reversing the direction of chemical reactions and influencing metabolic processes [4].

It is our opinion that the oxidative stress damages the structure of the cellular membrane, primarily the sodium-potassium ATP-ase, first of all. This fact induces a heavy alteration of the active transport mechanism between sodium (Na) and potassium (K), and it modifies oxide-reduction reactions between cytoplasmatic molecules. We think that these events are the biochemical 'trigger' for cancer. In fact, potassium is a critical regulator for cell metabolism control, as evidenced in cellular apoptosis [5-9]; it is the main cytoplasmatic cation (co-factor), and it acts like a catalyzer with enzymes and proteins [10] through a particular process called reversible salification of the aminic (NH₂) groups in a subacid environment. Moreover, some aminoacids (hystidine, proline, triptophane) have in their lateral chain a pyrrolic group in which the ethero-atom is composed of an NH group. This ring has a subacid pH mostly close to the NH group and, in this particular condition, the potassium is able to salify in a reversible way the iminic group substituting the hydrogen atom. We can note that the local pH change, as well as the presence of

oxidants, is able to destroy the aromatic character and open the pyrrolic ring. So this salification is no longer possible and K cannot execute its task.

In basic physiological conditions (or, as we say, 'at rest'), K is a cation mainly present inside the cell at concentrations on the order of 150 mmol/l, while on the extracellular side, concentration is approximately 5 mmol/l.

The cation sodium, which plays a fundamental role for the hydro-balance of the organism and has high chemical affinity with potassium, behaves in exactly the opposite way with respect to K: it is mainly present in extracellular area to the order of 150 mmol/l, whereas at the intracellular level, it is on the order of 5 mmol/l. In this way the two cations have a high concentration gradient between the inside and the outside of the cell.

These two cations play a crucial role in nerve conduction and in the mechanism of sensory perceptions.

The two scientists Moraveck and Kishi, Hungarian and Japanese respectively, conducted in the late 1930's some experiments on some types of tumors. Studying particularly the Rous sarcoma, they measured the loss of intracellular potassium. Their studies showed that this loss through the cytoplasmatic membrane allows the emission of sodium with a ratio that increases proportionately to the cellular degradation increase [11].

This fact seems to be the main characteristic of all types of tumors, confirmed also through simple electrolyte blood tests. Our Foundation normally requires such tests from cancer patients.

Probably the cause of this process should be put in relationship with the 'degradation' (that is to say 'opening') of pyrrolic rings in enzymes and proteins, thus making them unable to conduct their own biologic activity, and local pH modification, thus avoiding the reversible salification processes. In these conditions the intracellular potassium goes out of the membrane by simple diffusion, which increases at a par with the damage done to the pump. Simultaneously, by the same diffusion mechanism, sodium starts to cross the membrane in the opposite direction going into the cytoplasm.

This mechanism is very dangerous for the cell because:

- It starts a temporary, as well as lasting, transfer of calcium from intracellular deposits (for example the mitochondrion), that could be jointly responsible for the mithogenic stimulation;
- The glucose and the sodium are transported simultaneously into the cytoplasm; this movement increases with the sodium-potassium pump breakdown.

These reactions induce the cell to modify its own respiration process, in such a way that it reduces the oxidative phosphorylation and improve glycolysis (that is to say fermentation) substantially. A high production of lactic acid formed by piruvate reduction ensues. Stating that the piruvate is an inhibitor of mitosis, S phase starts up, its constant decrease into cytoplasm (due to the conversion into lactic acid) takes out this block over mitosis, directing the cell metabolism to uncontrolled proliferation. The intracellular pH is modified, tending to alkaline, and also cellular respiration is modified with a consequent considerable change of the 'Krebs cycle' [12].

All these reactions induce the destruction of the aromaticity of the ribose furanoid ring in the RNA; so the same RNA tends to polymerization, discharging stronger Van der Waals forces over the nucleus with a consequent transfer of wrong information from the 'peripheral side' to the 'headquarters' (the DNA) [13-14]. In this way the nuclear DNA undergoes mutation which leads up to carcinogenesis.

Potassium Ascorbate (CK) and Ribose (R) are able to counteract this process, protecting the cell against oxidative stress and fighting the uncontrolled proliferative process, as evidenced thanks to a research plan conducted by the Pantellini Foundation together with Prof. Ida Ortalli, Dr. Simonetta Croci and their colleagues of the Public Health Dept., University of Parma, Italy [15-16]. Italian biochemist Dr. Gianfrancesco Valsé Pantellini was the scientist who discovered these properties of the compound and the compound's surprisingly positive effects against cancer [17-18].

Ascorbic Acid (Asc) is a very powerful anti-oxidant and a very important vitamin for the human organism [19-20]. It is a penta-sugar with a furanoid structure (like Ribose), thus the ring responsible for biological activity is very similar to the pyrrolic one (it has oxygen as hetero-atom). CK is derived from the salification in subacid of the hydrogen atom within the Asc OH groups into the furanoid ring.

Ribose is the sugar more strictly connected with nucleotide biosynthesis. It is an integral part of the cell, and it plays a fundamental role in the cell's energetic metabolism. In particular it is a fundamental precursor of the RNA biosynthesis as well as of adenosine (which is an essential component in the production of ATP and is strongly involved with Na/K ATP-ase). When it is consumed orally, it is metabolized and does not interfere with glycolysis [21]. The use of a specific quantity (2%) of Ribose compared to Asc together with Potassium Ascorbate (RCK) and in the form of Potassium Ribosate (RK) can be explained by the potential catalytic activity of Ribose for the purpose of improving the compound efficacy.

In order to know with more accuracy the action mechanism of these compounds, and to evaluate their protective action, the properties of CK and RCK are investigated with short-term tests to establish their possible antimutagenic behavior. For this purpose, thanks to a research plan conducted by the Pantellini Foundation together with Prof. Giorgio Bronzetti and Dr. Clara Della Croce, of the Institute for Biology and Agricultural Biotechnology, National Council for Research (CNR) of Pisa (Italy), D7 strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* are employed as an eucaryotic genetic system; it constitutes a rapid, inexpensive and reproducible model that can be correlated also to a potential carcinogenetic effect. Moreover, its genome is completely sequenced [22] and 50% of yeast proteins seem to have significant levels of homology with human proteins.

METHODS AND RESULTS

Potassium Ascorbate (CK) is a Vitamin C-derived salt that is totally non-toxic and does not present any side effect. This salt is obtained as a reaction product of Asc salification (150 mg) in 20 cc of water by 300 mg of potassium dicarbonate (KHCO_3) at room temperature. These components should have a crystalline form of not less than 97% purity. The solution can be used for a long time, and it follows biologically the destiny of the ascorbic acid. In view of the low level doses and the non-toxic effects of this compound, potassium ascorbate has been used on man directly, to evaluate its effects on neoplastic pathologies.

This compound was given three times a day on an empty stomach:

- in the morning 20 minutes before breakfast;
- 45 minutes before lunch and 45 minutes before dinner.

The data *in vivo* refer to 1,200 samples of patients with different types of cancer, and they are reported by local practitioners only. This was due to the fact that, as a biochemist, Dr. Pantellini could neither visit patients nor keep their medical file. It follows that this data is not statistically homogeneous and it refers only to the quality of life and the staying alive.

All patients were in a very advanced tumoral phase; nearly 70% of them were in the so-called 'terminally ill phase', and clinical and normal basic assistance had exhausted their possible remedies, the only thing to do for them was therapy against pain. The remaining 30% was made up of patients who, after surgical interventions and/or radiotherapy or chemotherapy, had decided to stop all treatment as per medical advice.

In Fig.1 it is possible to observe a first significant element concerning the survival capability after 5 and 10 years from CK consumption by the patients. One has to keep in mind that people with very advanced oncological phases are being studied.

Comparing the survival rate capability of the patients after 5 and 10 years of CK treatment, we come to the interesting conclusions that, unexpectedly, these sets of data are not very different from each other; it seems that patients able to survive up to 5 years can reach the 10 years level and even more.

Fig. 2 is shows the range of symptom variability in a group of 30 patients affected by different types of cancer. It is possible to observe within 60 days, as an average value, that symptoms largely decrease and the patient' quality of life does improve radically.

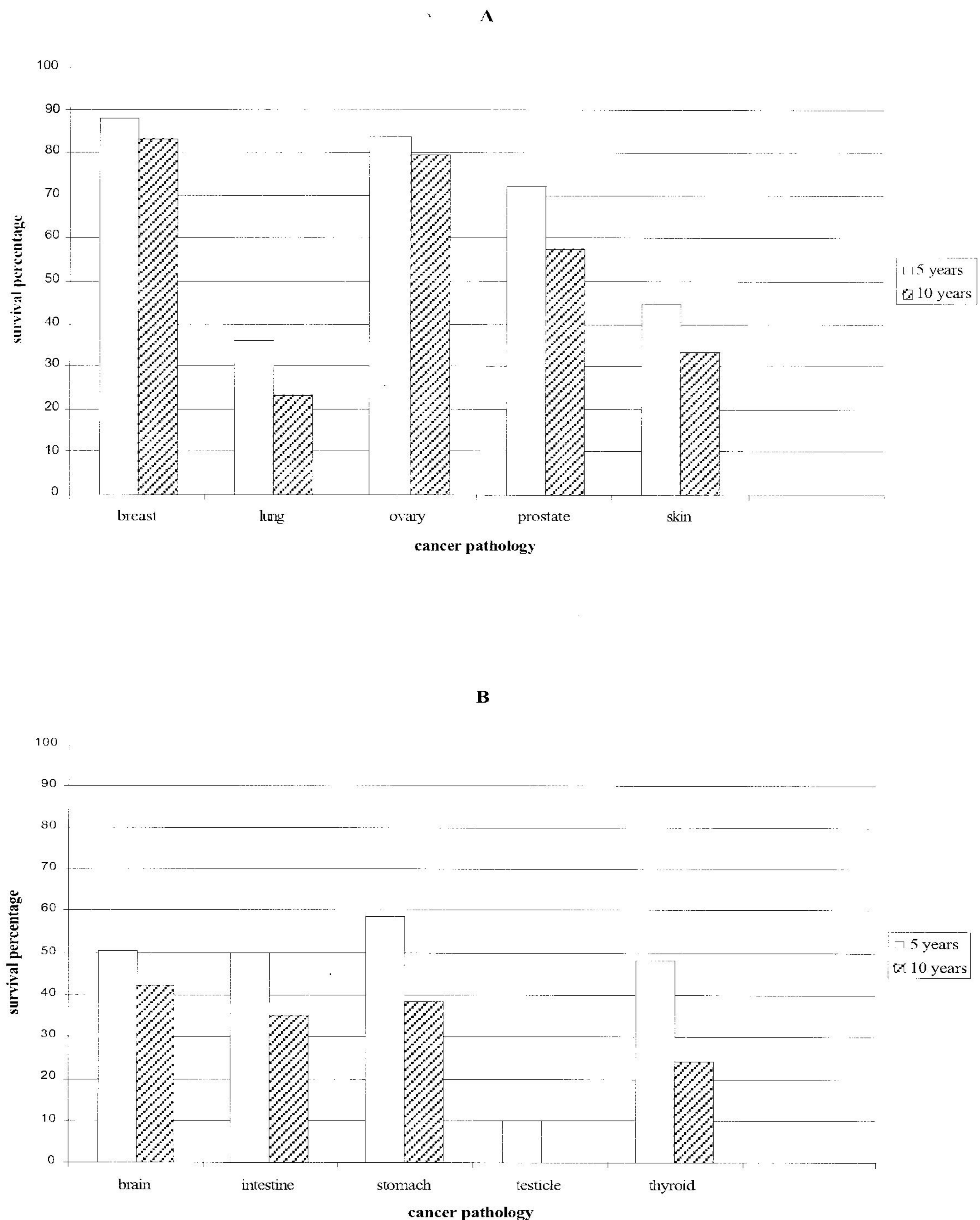


Figure 1. In A and B are represented the cancer pathologies vs. survival percentage. Testicular cancer in B represents an exception in the data due to a very low number of patients and to the particular aggressiveness of this syndrome in its advanced phases.

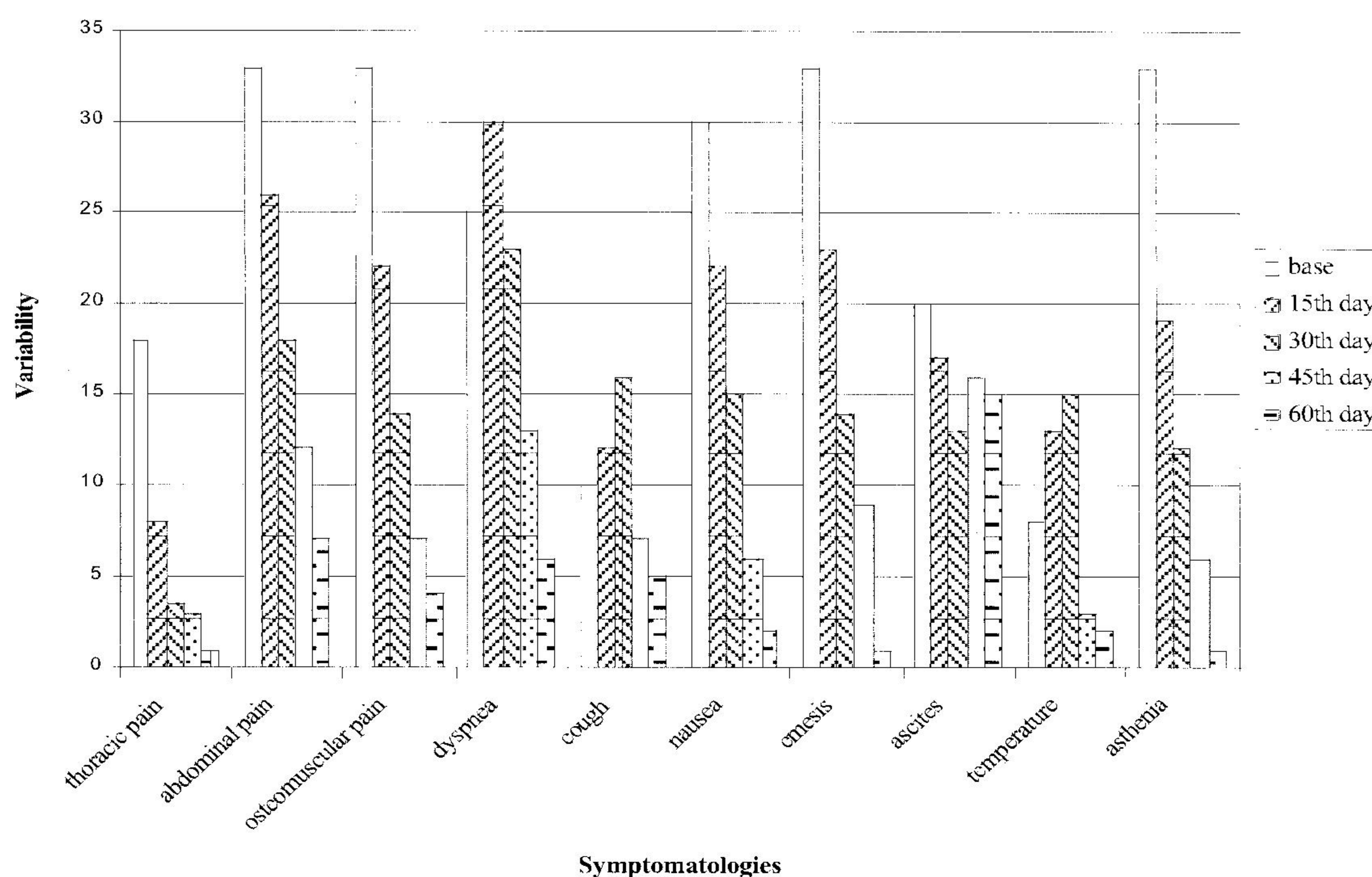


Figure 2. Symptom variability in a neoplasia mixed group. On the X-axis are reported all the symptomatology, while on the Y-axis are reported arbitrary numbers obtained through normalizing criteria. In point of fact, not all symptoms can be measured with instruments; therefore it is necessary to adopt numeric criteria of evaluation for the symptoms, known as psychometrical or psychophysical scales, which are either visual and/or analogic. Having adopted the starting criteria, data is rendered homogeneous through normalizing procedures.

Prof. Bronzetti, Dr. Della Croce and their group of the National Council of Research in Pisa, Italy, have used a D7 strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, obtained from F.K. Zimmermann, and they have measured Survival (S) and Point reverse Mutation (PM) [23] after incubation with AcetilPhenylHydrazine (APH) as oxidant to evaluate antimutagenic effect induced by CK and RCK.

Cellular culture: About 10^7 cells/ml have been inoculated in liquid complete medium containing 2% glucose, 2% bactopectone and 1% yeast extract, and incubated at 30°C for 48 h up to the stationary phase (100×10^6 cells/ml) (S).

Growing test procedure: To perform these experiments, CK and RCK at nM (nano-molar) concentrations were added in the liquid medium during stationary growth phase. Cells were counted to evaluate cytotoxicity during growth and then plated, after suitable dilutions, on complete and selective media to ascertain survival and revertants.

Results have been statistically analysed using the Analysis of Variance.

Fig. 3 shows the effects of CK and RCK on survival percentage rates in growing cells of D7 strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* after an overnight incubation at 30 °C with APH.

Fig. 4 shows the effects of CK and RCK on Point Reversion Mutation in growing cells of D7 strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* after an overnight incubation at 30 °C with APH.

We can see that CK and RCK recover significantly the decrease of Survival percentage and reduce significantly the increase of Point Mutation due to APH.

PREMESSA

Questa relazione descrive lo stato di avanzamento dell'attività scientifica, svolta durante il periodo novembre 2001-ottobre 2002, nell'ambito del programma di ricerca concordato per il conferimento di un Assegno di ricerca dal titolo "Valutazione dell'impatto ambientale per la salvaguardia e la tutela della salute umana: studio degli effetti di xenobiotici sul sistema monoossigenasico, attività genetica di sostanze naturali, con particolare riferimento a quelle contenute nella dieta attraverso l'utilizzo dei test a breve termine".

In questo lavoro ci siamo occupati di valutare la genotossicità e la eventuale azione antimutagena dei seguenti composti:

- ascorbato di potassio (e suoi componenti)
- ascorbato di potassio con ribosio

*Per l'esecuzione degli esperimenti è stato utilizzato, come sistema genetico, il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, in quanto costituisce un modello genetico rapido, semplice e poco dispendioso oltre ad essere riconosciuto a livello internazionale come organismo modello in grado di dare informazioni ed indicazioni valide anche su strutture di eucarioti più complessi. Le metodiche ed i protocolli utilizzati, inoltre sono quelli ampiamente riconosciuti dalla Comunità scientifica per lo studio di altre sostanze con effetto potenzialmente analogo a quelle che sono state oggetto della nostra ricerca*

Lo studio è stato svolto dalla dott.ssa Clara Maria Della Croce, nei Laboratori del reparto di Mutagenesi ed Ecotossicità dell'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA) (ex Istituto di Mutagenesi), presso l'Area di Ricerca del CNR a Pisa, sotto la responsabilità scientifica del Prof. Giorgio Bronzetti.

ASCORBATO DI POTASSIO

L'Ascorbato di potassio è un sale derivato dalla vitamina C facilmente solubile che si ottiene estemporaneamente sciogliendo in soluzione acquosa acido L-ascorbico e bicarbonato di potassio in forma cristallizzata purissima. I due componenti devono essere mantenuti separati (e protetti dall'umidità e dalla luce essendo igroscopici e fotosensibili) fino al momento dell'utilizzo perché la stabilità in soluzione viene mantenuta solo per poche ore. Lo studio sulle proprietà benefiche dell'ascorbato di potassio è iniziato casualmente alla fine degli anni '40 ad opera del Dott. Gianfrancesco Valsé Pantellini, biochimico fiorentino, sulla base di un fatto "fortuito": un amico orafo con un cancro inoperabile allo stomaco aveva ottenuto dei sorprendenti e straordinari benefici ingerendo, su suo consiglio, limonate zuccherate a cui, per errore, aggiungeva del bicarbonato di potassio invece dell'usatissimo bicarbonato di sodio.

L'importanza del potassio come cofattore e regolatore del metabolismo cellulare è stata anche recentemente messa in evidenza in alcuni articoli sui meccanismi di apoptosi cellulare [Hughes F, Bortner C, Purdy G, Cidlowski J (1997) Intracellular K^+ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. **J Biol Chem** (272), 30567-30576] [Bortner C, Hughes F, Cidlowski JA (1997) Primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. **J Biol Chem** (272):32436-32442] [Dallaporta B, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Larochette N, Brenner C, Marzo I, Kroemer G (1998): Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. **J Immun** 5605-5615] [Hughes FM Jr, Cidlowski JA. (1999) Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo **Adv Enzyme Regul**, 39:157-171] [Montague J, Bortner C, Hughes F, Cidlowski J (1999) A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis. **Steroids**, 64: 563-569].

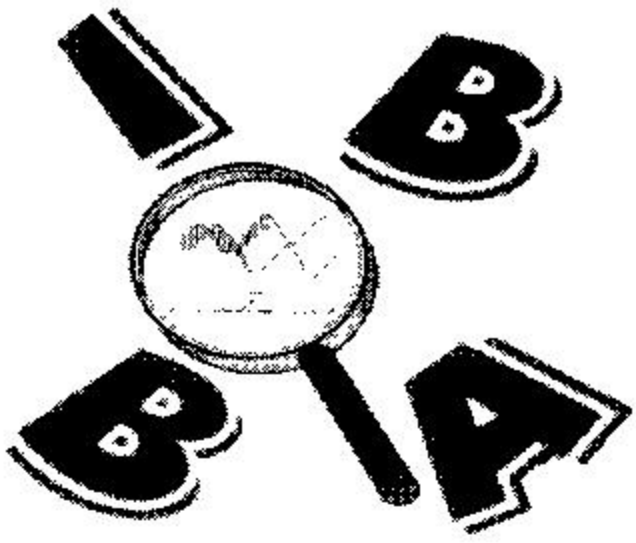
Inoltre, da studi condotti da uno dei pionieri della Chimica italiana, il Prof. Ciamician, è emerso che il potassio svolgerebbe la sua attività metabolica intracellulare salificando reversibilmente i gruppi amminici e gli anelli pirrolici degli enzimi e delle proteine citoplasmatiche in ambiente leggermente acido.

Dagli studi del Dott. Pantellini [Valsé Pantellini G (1970) Breve cenno sulla genesi dei tumori e sopra una eventuale terapia dei medesimi con sali di potassio e in particolare con ascorbato di potassio. **Rivista di Patologia e Clinica XXV (5):219-225**] [Valsé Pantellini G (1974) Legami idrogeno (H) e salificazione degli stessi da parte del potassio (K) nella strutturazione della materia vivente. **Rivista di Patologia e Clinica. XXIX (4):193-198**] e della Fondazione Valsé Pantellini [Valsé Pantellini G, Paoli G (1999) Meccanismo d'azione dell'ascorbato di potassio nei sistemi biologici. **LXXXV Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisica. Pavia, p.191**] [Crocì S, Ortalli I, Pedrazzi G, Paoli G, Monetti D (2000) Azione protettiva dell'ascorbato di potassio sull'ossidazione dell'emoglobina in globuli rossi umani. **LXXXVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisica, Palermo, 181**] [Crocì S, Pedrazzi G, Paoli G, Monetti D, Bronzetti G, Ortalli I (2001) Potassium ascorbate as protective agent in oxidation of red cells. Abstract of the **International Conference on Antioxidants in Cancer Prevention and Therapy**, Athens Greece, 1571-1572], è stato messo in evidenza che, in presenza di stress ossidativo, nel citoplasma vengono danneggiati proprio gli anelli pirrolici degli enzimi, delle proteine e dell'ATP-asi, con conseguente perdita di potassio, già evidenziata da oltre cinquant'anni [Von Euler H, Skarzynski B (1945) **La biochimica dei tumori**. Einaudi. Torino. **Cap.II, pp. 78-83**] inoltre, l'ascorbato di potassio può trasferire rapidamente gli ioni K^+ all'interno della cellula, in virtù della sua struttura eterociclica, in grado di sostituire per analogia i gruppi pirrolici. In tal modo sembra che possa ripristinarsi la adeguata concentrazione di potassio intracellulare, essenziale per mantenere le funzioni metaboliche cellulari.

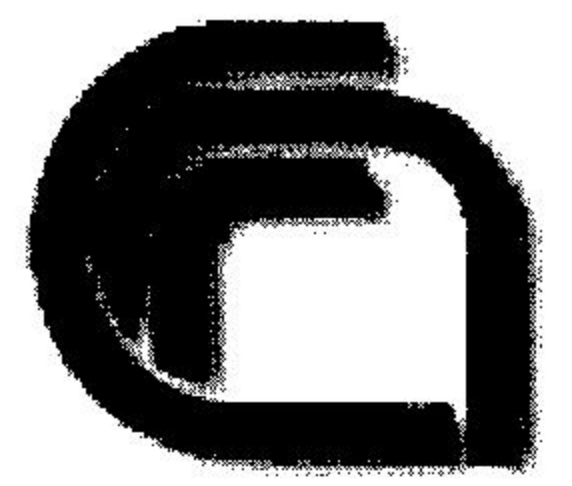
Inoltre, sodio, calcio, potassio, magnesio, presenti nei liquidi intra ed extracellulari, sono da considerarsi a vario titolo i "trasportatori dei segnali" fra cellula e cellula, perché queste permangono in un normale stato di proliferazione.

Proprio considerando che l'ascorbato di potassio è stato scarsamente studiato, lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutarne gli effetti genotossici ed antimutageni sia dei componenti che del composto in quanto tale, anche in combinazione con il ribosio, che ne dovrebbe potenziare l'efficacia. Lo studio è stato effettuato su cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* perché costituisce un modello genetico rapido e poco dispendioso per cercare di individuare i potenziali

- [11] H. Von Euler, B. Skarzynski, La biochimica dei tumori. Italian Translation. Einaudi (1945).
- [12] A.L. Lehninger, Biochemistry, 2nd Ed., Worth Publishers Inc. (1975).
- [13] G. L'Allemain, S. Paris, J. Pouyssegur, "Growth factor action and intracellular pH regulation in fibroblasts. Evidence for a major role of the Na⁺/H⁺ antiport", J. Biol. Chem. **259**, 5809-5815 (1984).
- [14] D. F. Gerson, H. Kiefer, W. Heufe, "Intracellular pH of mitogen-stimulated lymphocytes", Science, **216**, 1009-1010 (1982).
- [15] S. Croci, G. Pedrazzi, G. Paoli, D. Monetti, G. Bronzetti, I. Ortalli, "Potassium ascorbate as protective agent in oxidation of red cells". Abstract of the International Conference on Antioxidants in Cancer prevention and Therapy". Anticancer Res. **21**, 1571-1572 (2001).
- [16] S. Croci, G. Pedrazzi, G. Paoli, D. Monetti, I. Ortalli, "Potassium ascorbate as protective agent in the oxidation of the red blood cells". Hyperfine Interactions (C). Proceedings of the International Conference on the Applications of the Mössbauer effect (ICAME 2001). M.F. Thomas, J.M. Williams, T.C. Gibb Ed.(s), 241-244, Kluwer Academic Publishers (2002).
- [17] G. Valsé Pantellini, "Breve cenno sulla genesi dei tumori e sopra una eventuale terapia dei medesimi con sali di potassio e in particolare con ascorbato di potassio". (In Italian) Rivista di Patologia e Clinica XXV 219-225 (1970).
- [18] G. Valsé Pantellini, "Legami idrogeno (H) e salificazione degli stessi da parte del potassio (K) nella strutturazione della materia vivente", (In Italian) Rivista di Patologia e Clinica XXIX 193-198 (1974).
- [19] W. Lohmann, "Ascorbic acid and cancer", Annals of the NYAS **498**, 402-417 (1987).
- [20] W. Lohmann, "Structure of ascorbic acid and its biological function. VI. Its importance for the Na⁺/K⁺-transport", Biophys. Struct. Mech. **10**, 205-210 (1984).
- [21] M. Pizzichini, V. Micheli, R. Marcolongo, E. Marinello, "Metabolismo del riboso nell'uomo", (In Italian) Boll. Soc. It. Biol. Sper. **LIV**, 420-424 (1978).
- [22] D.E. Bassett Jr., M.S. Boguski, P. Hieter, "Yeast genes and human disease", Nature **379**, 589-590 (1996).
- [23] F.K. Zimmermann, R. Kern, H. Rasenberger, "A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing-over, mitotic gene conversion and reverse mutation", Mutat. Res. **28**, 381-388 (1975).



Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria



*Fondazione Internazionale
Valsé Pantellini
Per la Ricerca e lo Studio Delle Malattie Degenerative*

Studio sull'ascorbato di potassio ed i suoi componenti

ESTRATTO DELLA RELAZIONE C. N. R.

Clara Maria Della Croce

Laboratorio di Mutagenesi ed Ecotossicità

Area di Ricerca del CNR - Pisa

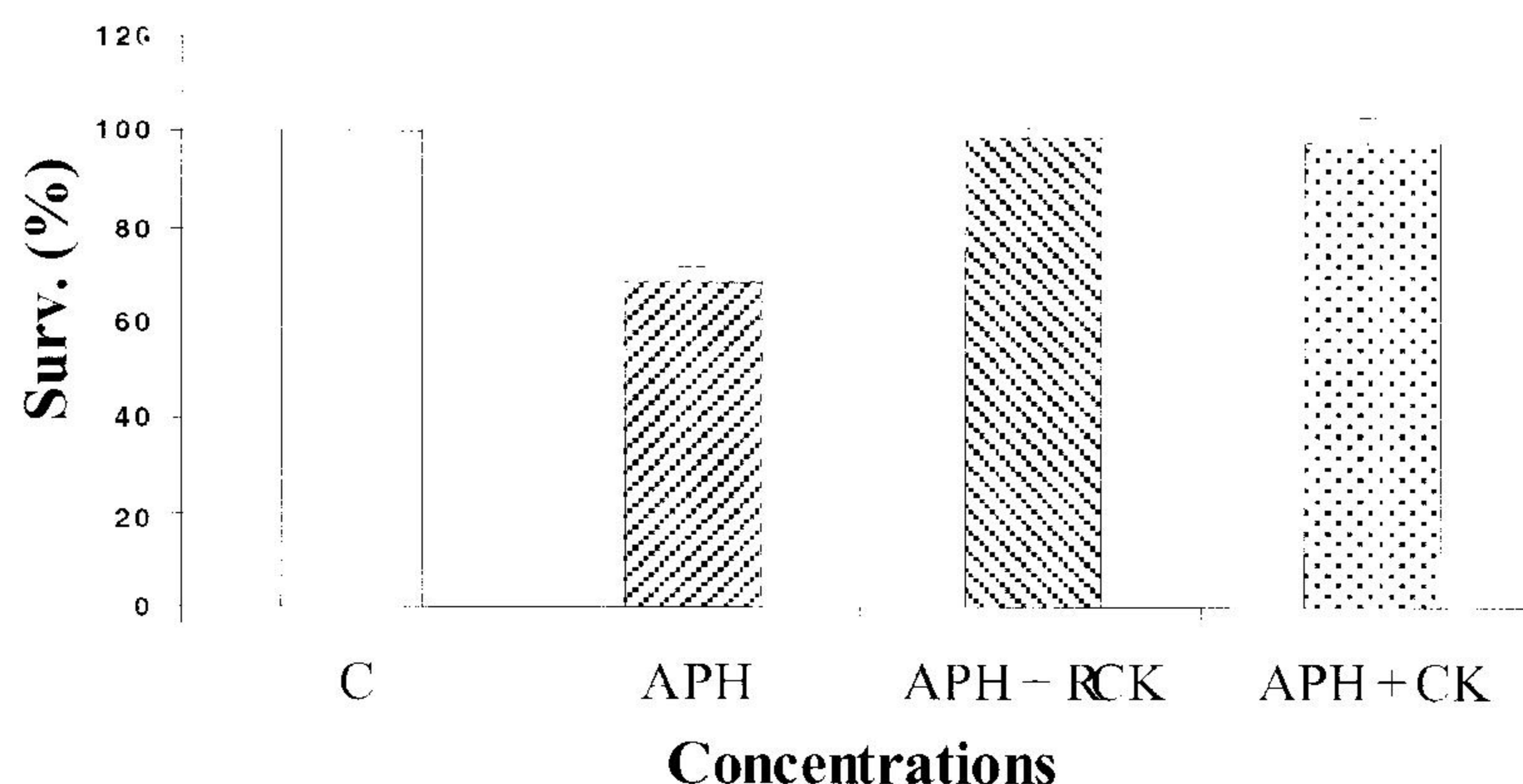


Fig.3: Growing Test: Survival – Antimutagenesis. C – Control; APh – AcetilPhenylHydrazine 10 mM; RCK – Asc 3 nM + KHCO_3 6 nM + R 0.06 nM; CK – Asc 3 nM + KHCO_3 6 nM.

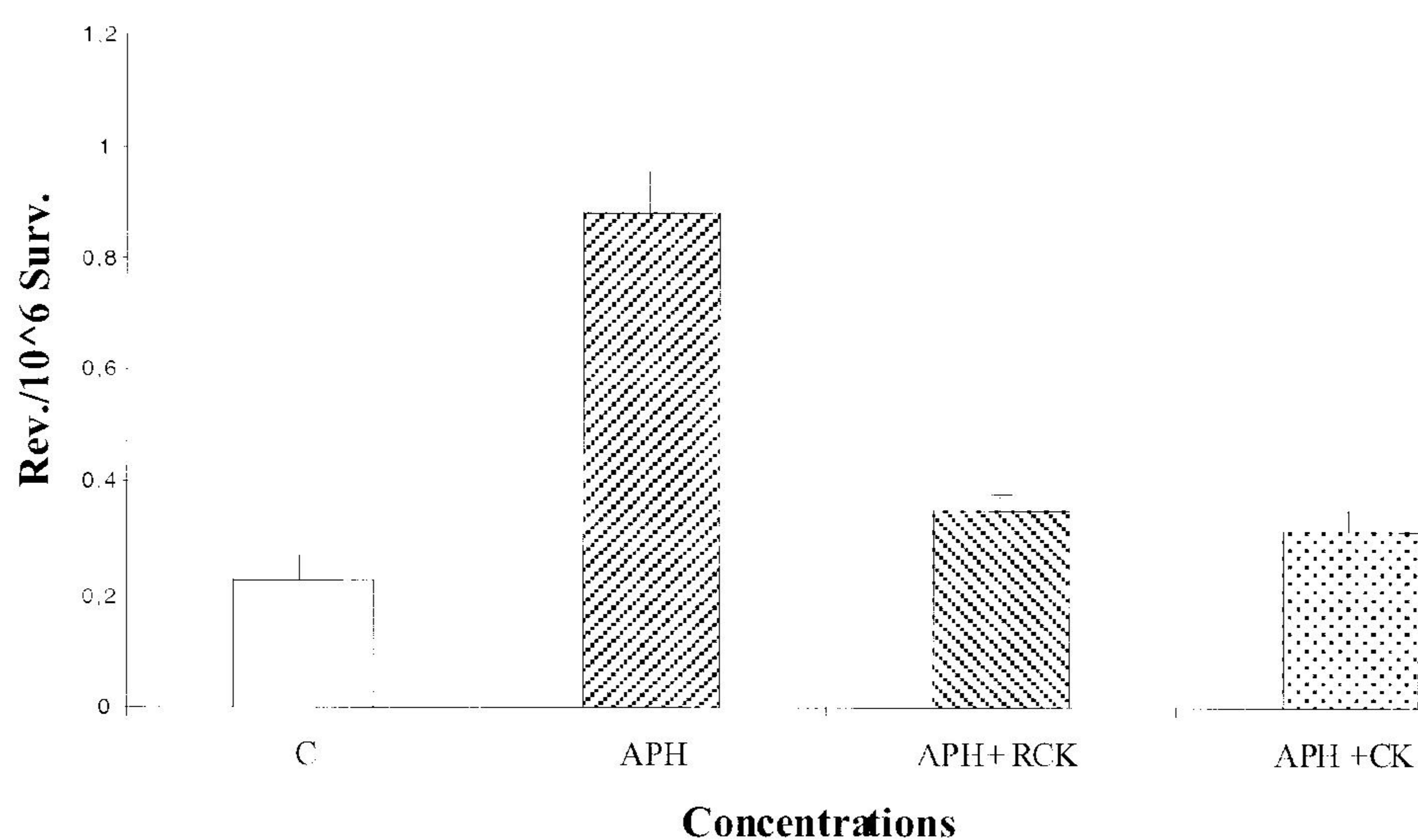


Fig.4: Growing test: Point Mutation – Antimutagenesis. C – Control; APh – AcetilPhenylHydrazine 10 mM; RCK – Asc 3 nM + KHCO_3 6 nM + R 0.06 nM; CK – Asc 3 nM + KHCO_3 6 nM.

DISCUSSION:

The extremely promising data clearly demonstrates that CK and RCK show a real effect against cancer *in vivo*, and an antimutagenic behavior *in vitro* on yeast *Saccharomices cerevisiae* at nM concentration. These facts can be related to the carrier properties of Asc as a consequence to its own specific and heterocyclic structure, allowing a fast K intracellular transfer. I think that this characteristic of Asc carries out the main role in CK and RCK together with its antioxidant action. Moreover, I am also convinced that Ribose could inhibit the RNA polymerization process during the cellular degenerative process, salifying potassium in a way analogous to that of Asc.

The presence of K in cancer cell can induce the related effect of removing Sodium (and also glucose, for the sinport explained in the introduction) from the intracellular region. So, this presence produces:

- a new modification in local intracellular pH;
- a fast lowering of the nutritive reserves, reducing glycolysis and reintroducing a block over mitosis; in this way it is possible to inhibit the uncontrolled proliferation

This data could suggest what we might expect from the CK and RCK therapy, as well as how the assumption of these compounds can really produce significant benefits in the struggle against cancer.

In fact, CK and RCK can operate at different levels:

- at the prevention level by maintaining the correct concentration of electrolytes and improving the cellular metabolism;
- in the presence of cellular degenerative risk by offering to the cell a protective system and adjusting the electrolytic imbalance,
- in the presence of tumoral attack, making the environment asphyxial for tumoral cells.

In conclusion, the further consideration of this job is that degeneration does not start from direct damage to nuclear DNA, but from a cytoplasmatic anomaly; that is to say, the damage comes from the 'peripheral side'. This means that DNA functionality can be strongly influenced by different components (especially different types of RNA), by the internal cellular environment, and also by cell-cell communications.

It is evident that this hypothesis, if confirmed, could alter the basic principles of molecular biology, which can be summed up in the 'central dogma'. Nevertheless, it is my opinion that we have to follow this new road in our quest to understand better the 'cancer question' and its possible solutions.

REFERENCES:

- [1] B. Halliwell, "Free radicals and antioxidants: a personal view", *Nutr. Rev.* **52**, 253-265 (1994).
- [2] C.C. Winterbourn, "Free radicals toxicology and antioxidant defence", *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **22**, 877-880 (1995).
- [3] R.V. Bensasson, E.J. Land, T.G. Truscott, Excited states and free radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press (1993).
- [4] R.S. Wadas, Biomagnetism. Ellis Horwood Lim. England (1991).
- [5] F. Hughes, C. Bortner, G. Purdy, J. Cidlowski, "Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes". *J. Biol. Chem.* **272**, 30567-30576 (1997).
- [6] C. Bortner, F. Hughes, J.A. Cidlowski, "Primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis", *J. Biol. Chem.* **272**, 32436-32442 (1997).
- [7] B. Dallaporta, T. Hirsch, S.A. Susin, N. Zamzami, N. Larochette, C. Brenner, I. Marzo, G. Kroemer, "Potassium leakage during the apoptotic degradation phase", *J. Immun.* 5605-5615 (1998).
- [8] F.M. Hughes, Jr., J.A. Cidlowski, "Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo", *Adv. Enzyme Regul.*, **39**, 157-171 (1999).
- [9] J. Montague, C. Bortner, F. Hughes, J. Cidlowski, "A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis", *Steroids*, **64**, 563-569 (1999).
- [10] L.A. Moran, K.G. Scrimgeour, H.R. Horton, S.O. Raymond, J.D. Rawn, Biochemistry. 2nd Ed., Prentice Hall Inc. (1994).

effetti tossici delle sostanze che devono essere saggiate [Plevani P, Foiani M, Lucchini G (1997): Il lievito: un organismo modello. **Le Scienze** 351: 84-92].

RISULTATI

Ceppo D7 Sostanze Singole

Sospensione: incubazione 2 ore in tampone a 37 °C (Fase stazionaria)

Non è stato messo in evidenza alcun effetto sulla sopravvivenza e sulla conversione genica a concentrazioni comprese tra 1 nM e 10mM (figure 1,2)

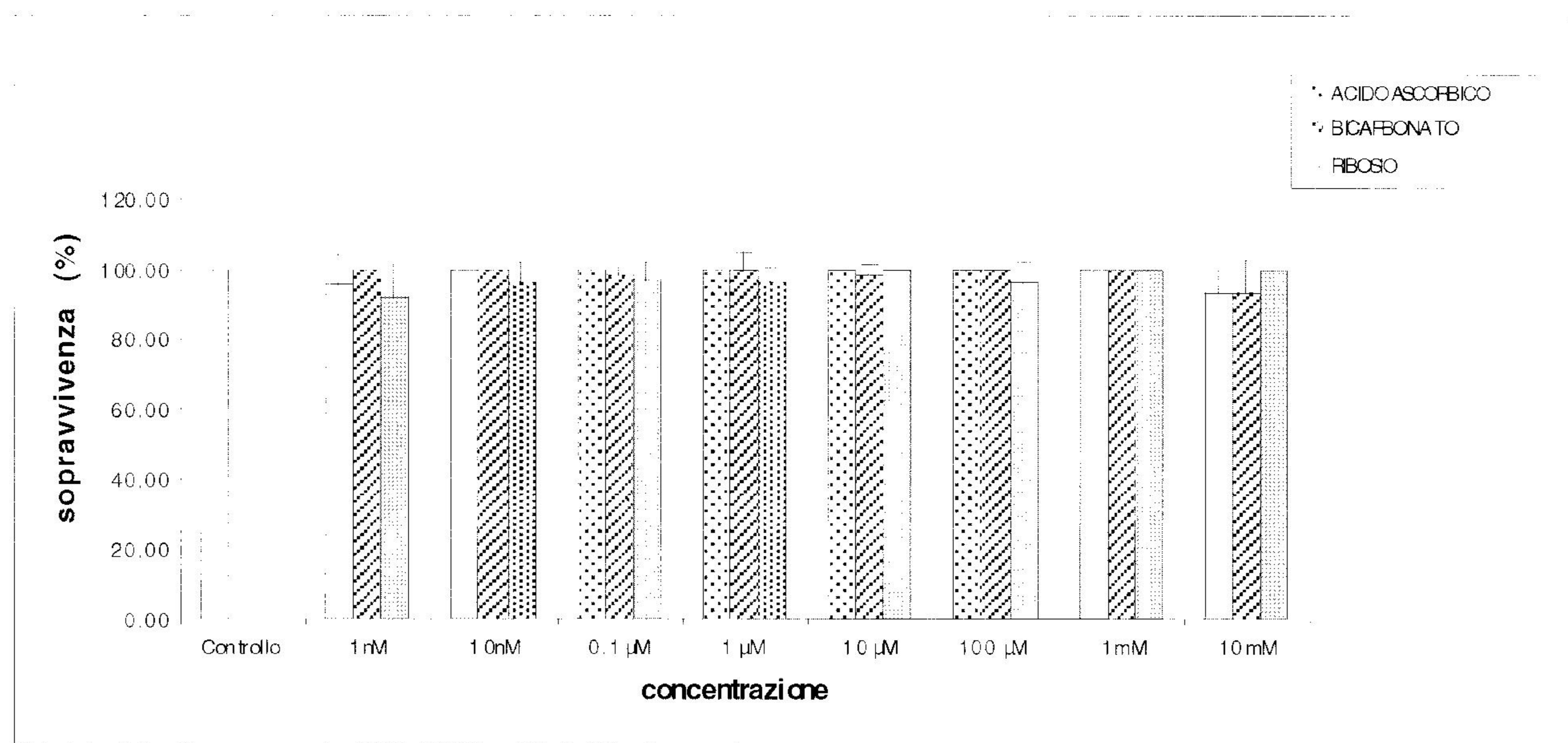


Fig 1: Effetto dell'acido ascorbico, del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla sopravvivenza (%) in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

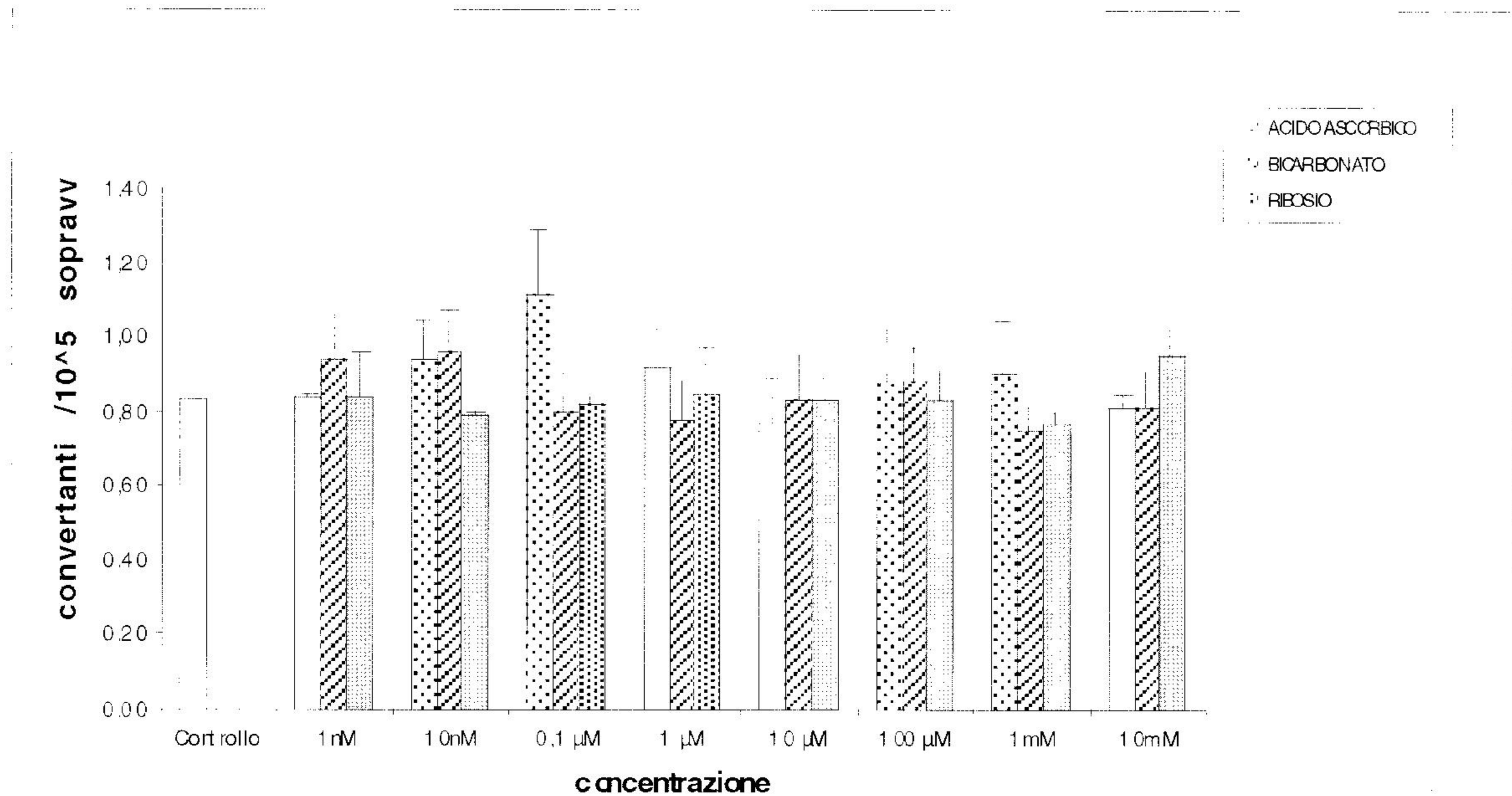


Fig 2: Effetto dell'acido ascorbico del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla conversione genica, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae* prelevate dalla fase stazionaria.

Il ribosio (10 mM) ha aumentato significativamente la frequenza di mutazione puntiforme rispetto al controllo (figura 3)

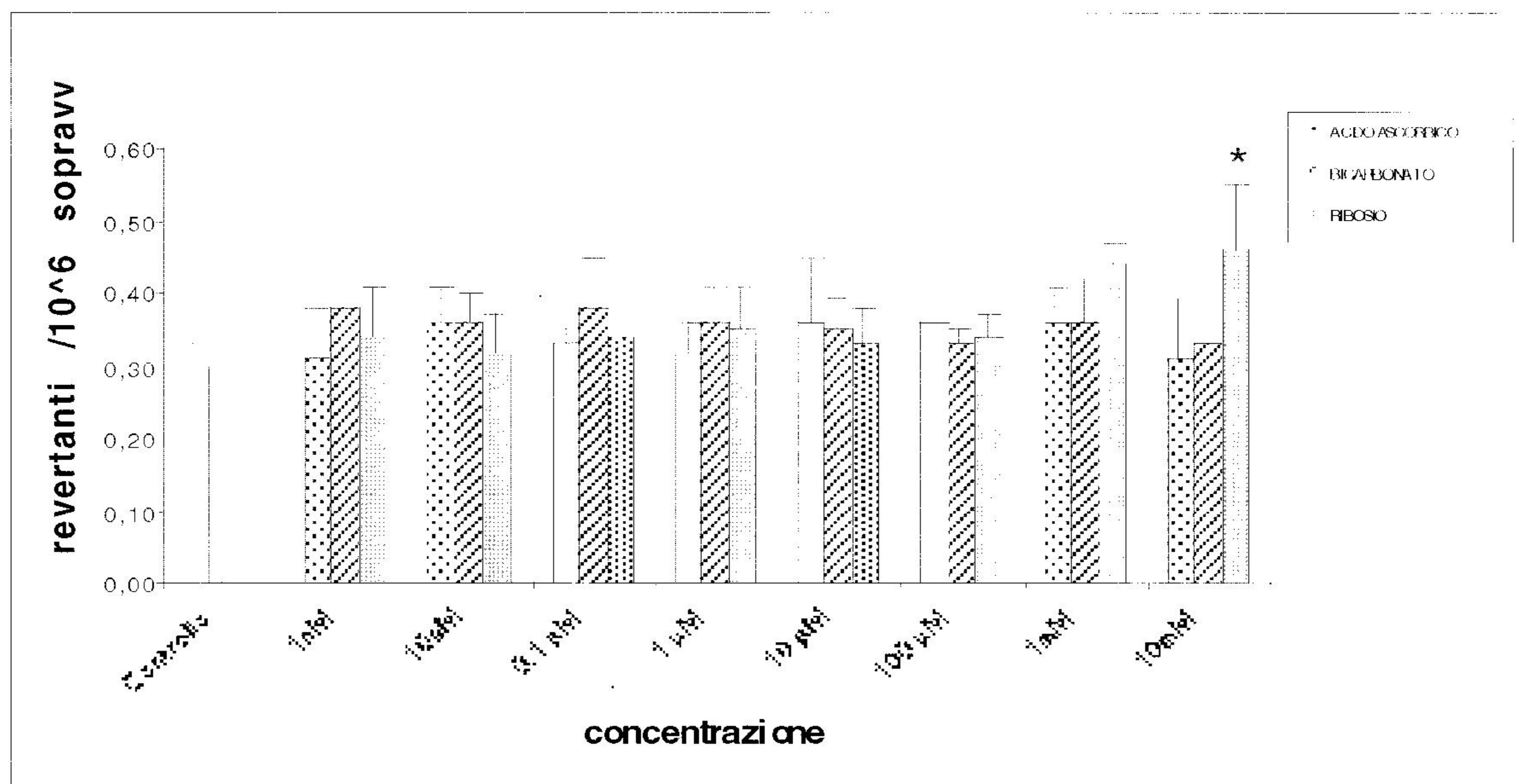


Fig 3: Effetto dell'acido ascorbico, del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla mutazione puntiforme, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

* aumento significativo rispetto al controllo

Non è stato messo in evidenza alcun effetto sulla sopravvivenza e sulla conversione genica e sulla mutazione puntiforme a concentrazioni comprese tra 1 nM e 1mM (Figure 4,5,6)

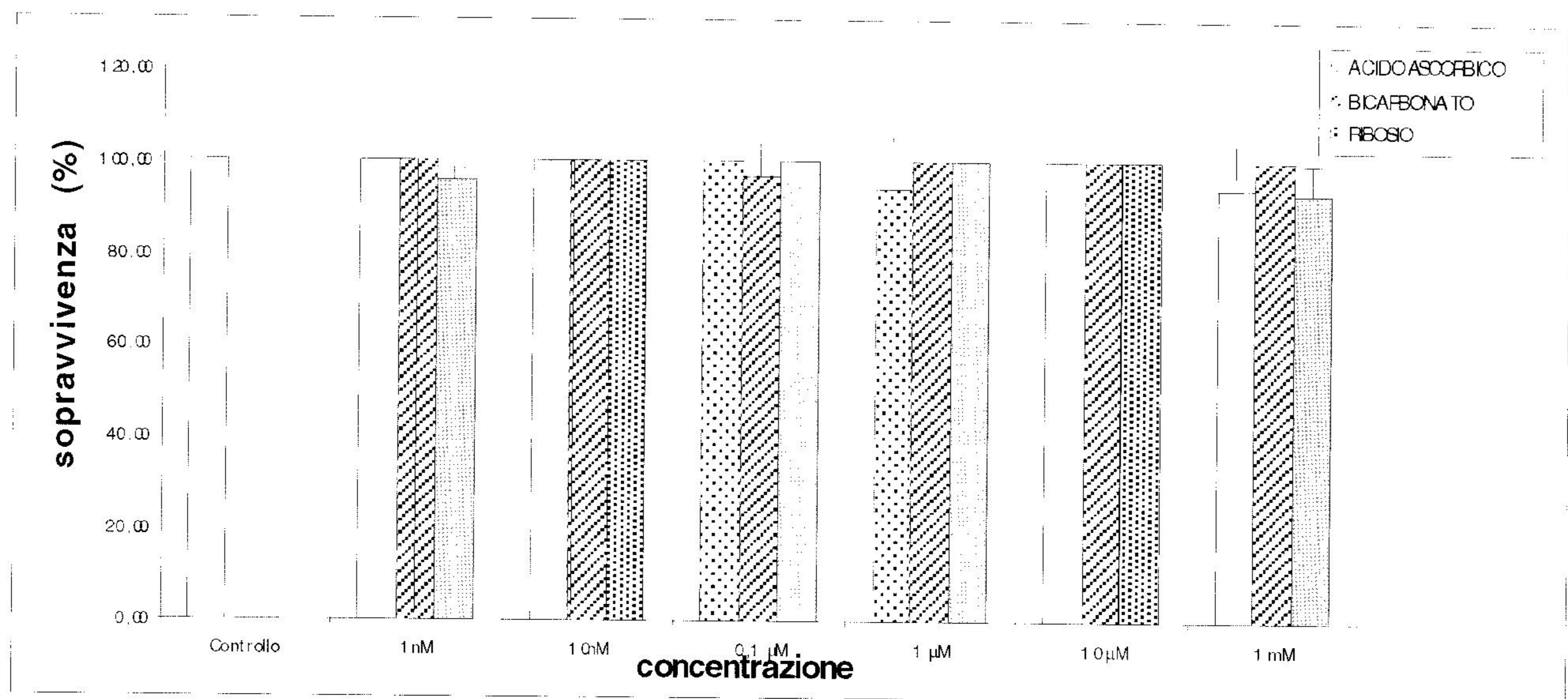


Fig 4: Effetto dell'acido ascorbico del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla sopravvivenza (%) in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

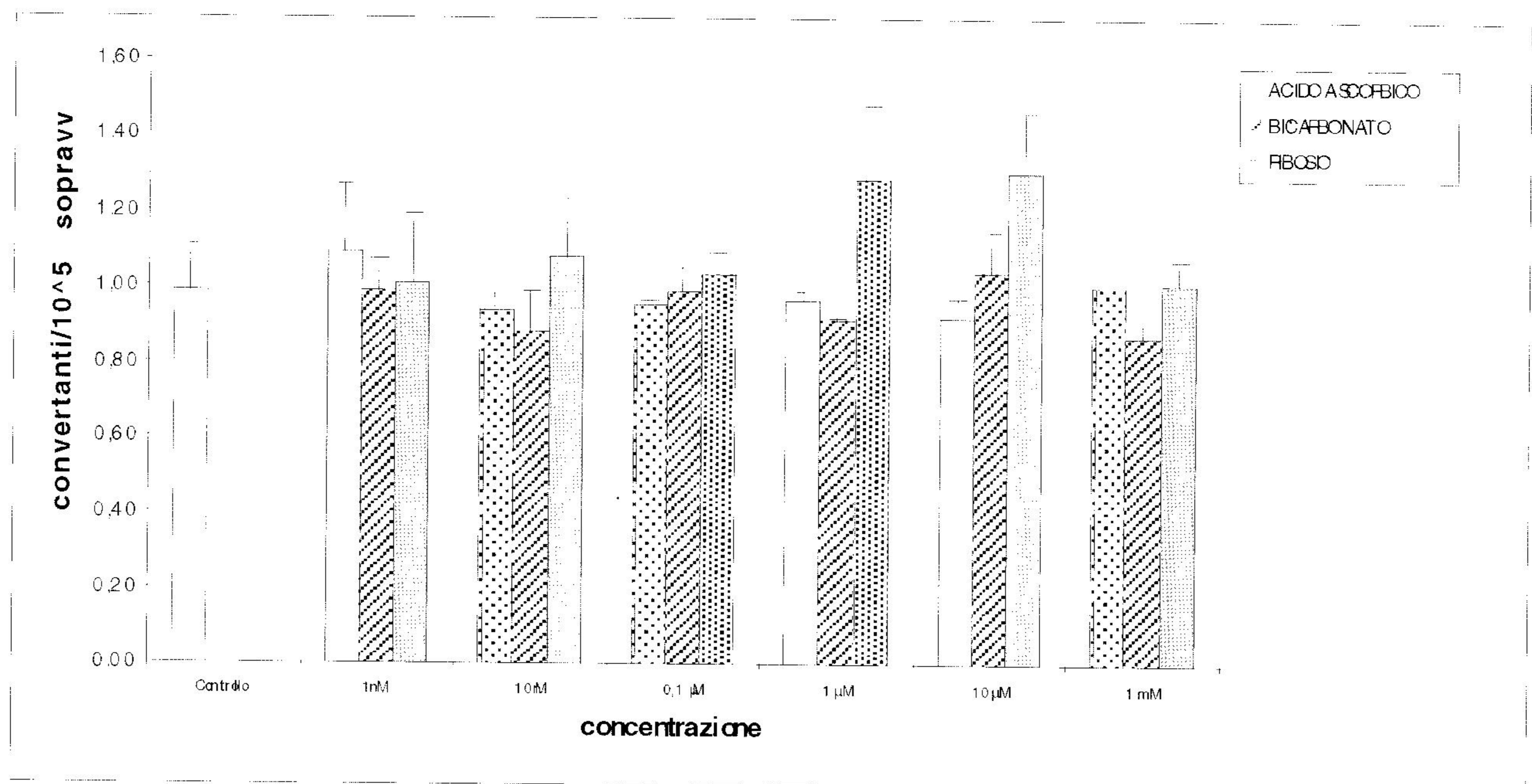


Fig 5: Effetto dell'acido ascorbico, del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla conversione genica, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

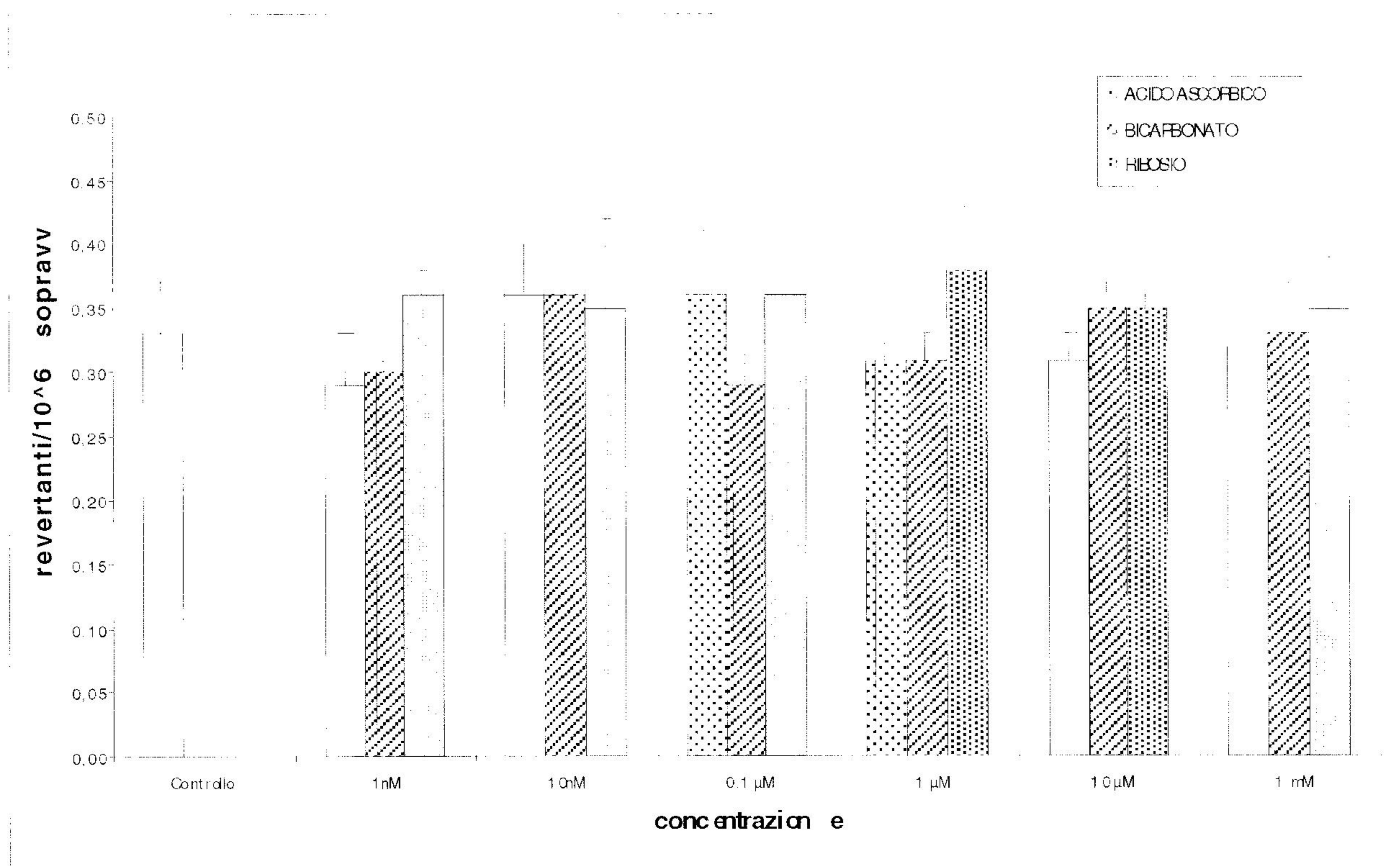


Fig 6: Effetto dell'acido ascorbico, del ribosio e del bicarbonato di potassio, saggiati singolarmente, sulla mutazione puntiforme, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria

Ceppi EG

Test delle generazioni: incubazione overnight a 30°C

EG 103: il perossido d'idrogeno 5 mM ha ridotto significativamente il numero di generazioni; rib 1 nM e la combinazione asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM hanno recuperato significativamente la diminuzione (tabella 8).

EG 103	Generazioni
Controllo	2,18 ± 0,23
asc. 1 nM	2,41 ± 0,04
asc. 10 nM	2,43 ± 0,08
rib. 1 nM	1,92 ± 0,30
rib. 10 nM	2,10 ± 0,06
kbic. 1 nM	2,15 ± 0,18
kbic. 10 nM	2,11 ± 0,10
H ₂ O ₂ 5 mM	citotox *
asc. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
asc. 10 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
rib. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	1,63 ± 0,34**
rib. 10 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
kbic. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
kbic. 10 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
asc. 1 nM + kbic. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
rib. 1 nM + kbic. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
asc. 1 nM + rib. 1 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	Citotox
asc. 1 nM + kbic. 1 nM	2,06 ± 0,04
rib. 1 nM + kbic. 1 nM	2,19 ± 0,13
asc. 1 nM + rib. 1 nM	1,99 ± 0,13
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM	2,11 ± 0,07
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM + H ₂ O ₂ 5 mM	0,71 ± 0,08**

Tab 8: Effetto dell'acido ascorbico (asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato (kbic), saggiati singolarmente ed in combinazione, sul numero di generazioni compiute dal ceppo di lievito *Saccharomyces cerevisiae* EG 103 (wild type) dopo una incubazione overnight con le sostanze.

** : aumento rispetto al controllo positivo

* : diminuzione rispetto al controllo

EG 118: il perossido d'idrogeno 4 mM ha ridotto significativamente il numero di generazioni; la combinazione asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM è stata in grado di recuperare in modo significativo la diminuzione (tabella 10)

EG 118	Generazioni
Controllo	2,81±0,30
H ₂ O ₂ 4 mM	0,47±0,04*
asc. 10 nM + kbic. 10 nM + H ₂ O ₂ 4 mM	0,45±0,03
asc. 10 nM + kbic. 10 nM	3,12±0,05
rib. 10 nM + kbic. 10 nM + H ₂ O ₂ 4 mM	0,48±0,03
asc. 10 nM + rib. 10 nM + H ₂ O ₂ 4 mM	0,50±0,02
rib. 10 nM + kbic. 10 nM	3,10±0,08
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM	2,81±0,22
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM + H ₂ O ₂ 4 mM	0,80±0,12 **

Tab 10: Effetto dell'acido ascorbico (asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato (bic), saggiati in combinazione, sul numero di generazioni compiute dal ceppo di lievito *Saccharomyces cerevisiae* EG 118 (mutante SOD citoplasmatica) dopo una incubazione overnight con le sostanze.

*: diminuzione rispetto al controllo

**: aumento rispetto al controllo positivo

EG 133: il perossido d'idrogeno 3 mM ha ridotto significativamente il numero di generazioni; la combinazione asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM è in grado di recuperare in modo significativo la diminuzione (tabella 11)

EG 133	Generazioni
Controllo	2,71±0,05
H ₂ O ₂ 3 mM	Citotox *
asc. 1 nM + kbic. 1 nM	2,58±0,02
asc. 1 nM + kbic. 1 nM + rib. 1 nM	2,69±0,04
asc. 1 nM + rib. 1 nM	2,71±0,01
rib. 1 nM + kbic. 1 nM	2,74±0,02
asc. 1 nM + kbic. 1 nM + H ₂ O ₂ 3 mM	citotox
rib. 1 nM + kbic. 1 nM + H ₂ O ₂ 3 mM	citotox
asc. 1 nM + rib. 1 nM + H ₂ O ₂ 3 mM	citotox
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM	2,81±0,08
asc. 3 nM + kbic. 6 nM + rib. 0,06 nM + H ₂ O ₂ 3 mM	1,22±0,23 **

Tab 11: Effetto dell'acido ascorbico (asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato (kbic), saggiati in combinazione, sul numero di generazioni compiute dal ceppo di lievito *Saccharomyces cerevisiae* EG 133 (doppio mutante) dopo una incubazione overnight con le sostanze.

*: diminuzione rispetto al controllo

**: aumento rispetto al controllo positivo

ESPERIMENTI DI ANTIMUTAGENESI

Crescita: incubazione per 2 ore in terreno a 30 °C

L'acqua ossigenata non avuto alcun effetto sulla percentuale di sopravvivenza, mentre ha aumentato di circa 10 volte sia la conversione genica che la mutazione puntiforme. La combinazione asc 3 nM+kbic. 6nM+ rib.0,06 nM ha diminuito significativamente la frequenza di mutazione puntiforme indotta dall'acqua ossigenata (tabella 6)

	Sopravvivenza	CG	MP
	%	conv/10 ⁵ sop	rev/10 ⁶ sop
Controllo	100	1,58 ± 0,20	0,53 ± 0,09
H₂O₂ 200 mM	88,00 ± 13,50	15,63 ± 1,40 **	5,23 ± 0,61 **
+ asc 3 nM+kbic 6nM	94,00 ± 7,39	13,40 ± 1,78	5,32 ± 0,45
+ kbic 6nM+rib. 2nM	83,33 ± 8,50	15,02 ± 0,67	5,79 ± 0,88
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,18nM	82,00 ± 14,93	15,36 ± 1,11	4,73 ± 0,69
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,45nM	100	14,39 ± 0,49	5,44 ± 0,53
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,06nM	100	16,65 ± 0,39	2,57 ± 0,42 *
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,1nM	100	16,79 ± 0,40	5,04 ± 0,16
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,2nM	85,50 ± 0,53	15,05 ± 1,03	5,48 ± 1,00

Tab 6 : Effetto dell'acido ascorbico (asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato di potassio (Kbic), saggiati in combinazione, sulla sopravvivenza, sulla conversione genica (CG) e la mutazione puntiforme (MP) in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, con test in crescita (terreno 2%), trattate per 2 h con acqua ossigenata e composti

*: diminuzione rispetto al controllo positivo

**: aumento rispetto al controllo

Crescita: incubazione per 0,5 ore in terreno a 30 °C

L'acqua ossigenata non avuto alcun effetto sulla percentuale di sopravvivenza, mentre ha aumentato di circa 7 volte sia la conversione genica mentre non ha avuto effetto sulla mutazione puntiforme. Le combinazioni. asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,2nM e asc 3 nM+kbic 6nM hanno diminuito significativamente la conversione genica indotta dall'acqua ossigenata (tabella 7)

	Sopravvivenza	CG	MP
	%	conv/10 ⁵ sop	rev/10 ⁶ sop
Controllo	100	1,33 ± 0,19	0,44 ± 0,06
H ₂ O ₂ 25 mM	98,5 ± 3,67	10,34 ± 0,86 **	0,51 ± 0,03
+ asc 3 nM+kbic 6nM	98,00 ± 3,37	5,30 ± 1,29*	0,50 ± 0,03
+ kbic 6nM+rib. 2nM	93,00 ± 8,89	9,90 ± 0,56	0,51 ± 0,03
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,18nM	97,00 ± 3,46	10,16 ± 0,53	0,54 ± 0,04
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,45nM	100	10,16 ± 0,61	0,54 ± 0,05
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,06nM	92,67 ± 12,70	10,67 ± 0,69	0,52 ± 0,06
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,1nM	96,00 ± 6,93	10,36 ± 0,91	0,49 ± 0,05
+ asc 3 nM+kbic 6nM+rib.0,2nM	97,25 ± 5,50	7,33 ± 0,17 *	0,46 ± 0,06

Tab 7: Effetto dell'acido ascorbico (asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato di potassio (Kbic), saggiati in combinazione, sulla sopravvivenza, sulla conversione genica (CG) e la mutazione puntiforme (MP) in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, con test in crescita (terreno 2%), trattate per 0,5 h con acqua ossigenata e composti.

*: diminuzione rispetto al controllo positivo

**: aumento rispetto al controllo

Crescita: incubazione per 48 ore in terreno a 30 °C (stazionaria)

Le combinazioni non hanno influenzato la sopravvivenza e la mutazione puntiforme (figura 9,11); La combinazione asc 1 μ M + + Kbic1 mM + rib 20 nM ha incrementato significativamente la frequenza di conversione genica (figura 10).

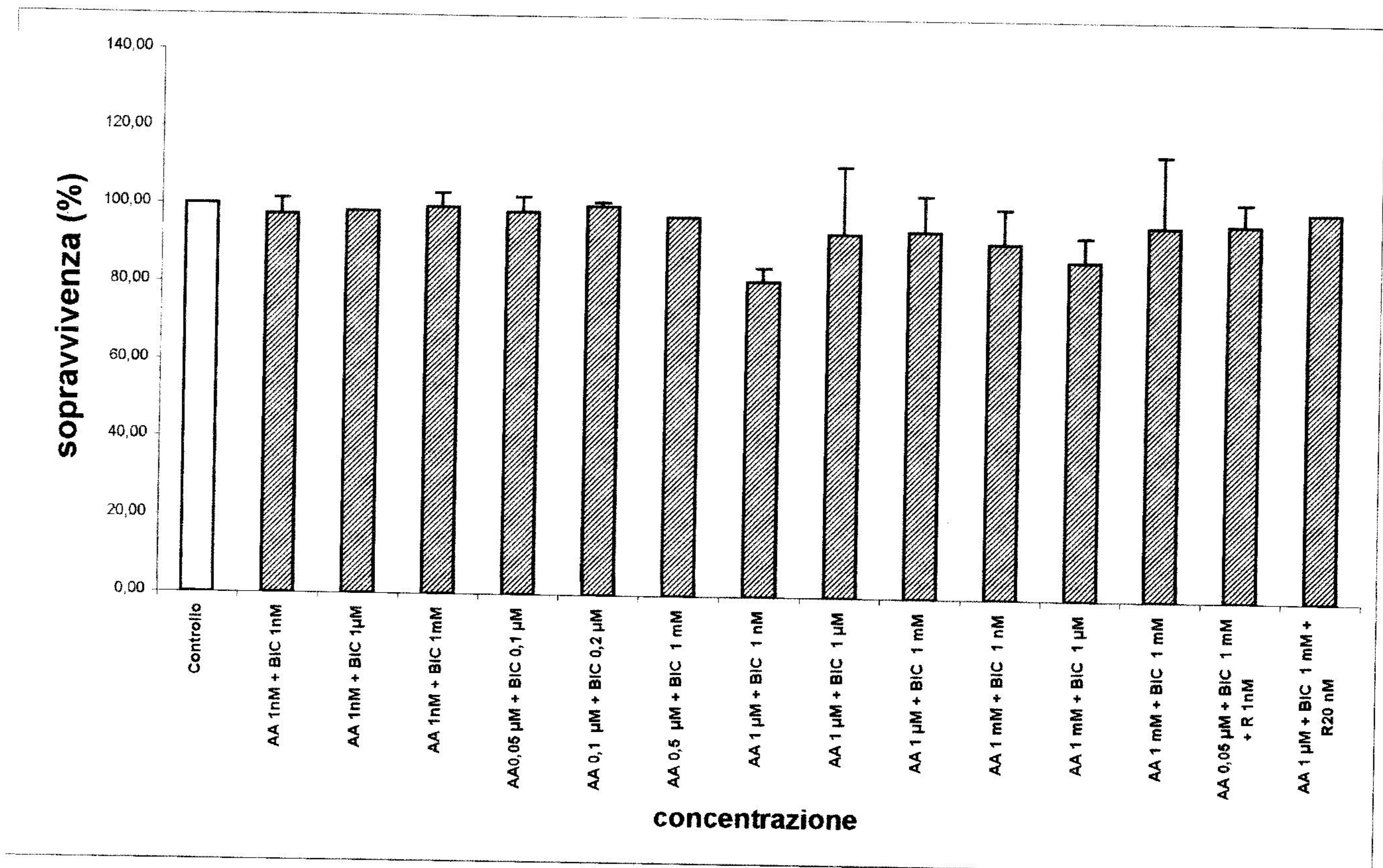


Fig 9: Effetto dell'acido ascorbico (Asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato di potassio (kbic), saggiati in combinazione, sulla sopravvivenza, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

Kbic 1nM+ rib 1 mM: non hanno avuto alcun effetto

Kbic 1mM+ rib 1 nM: non hanno avuto alcun effetto

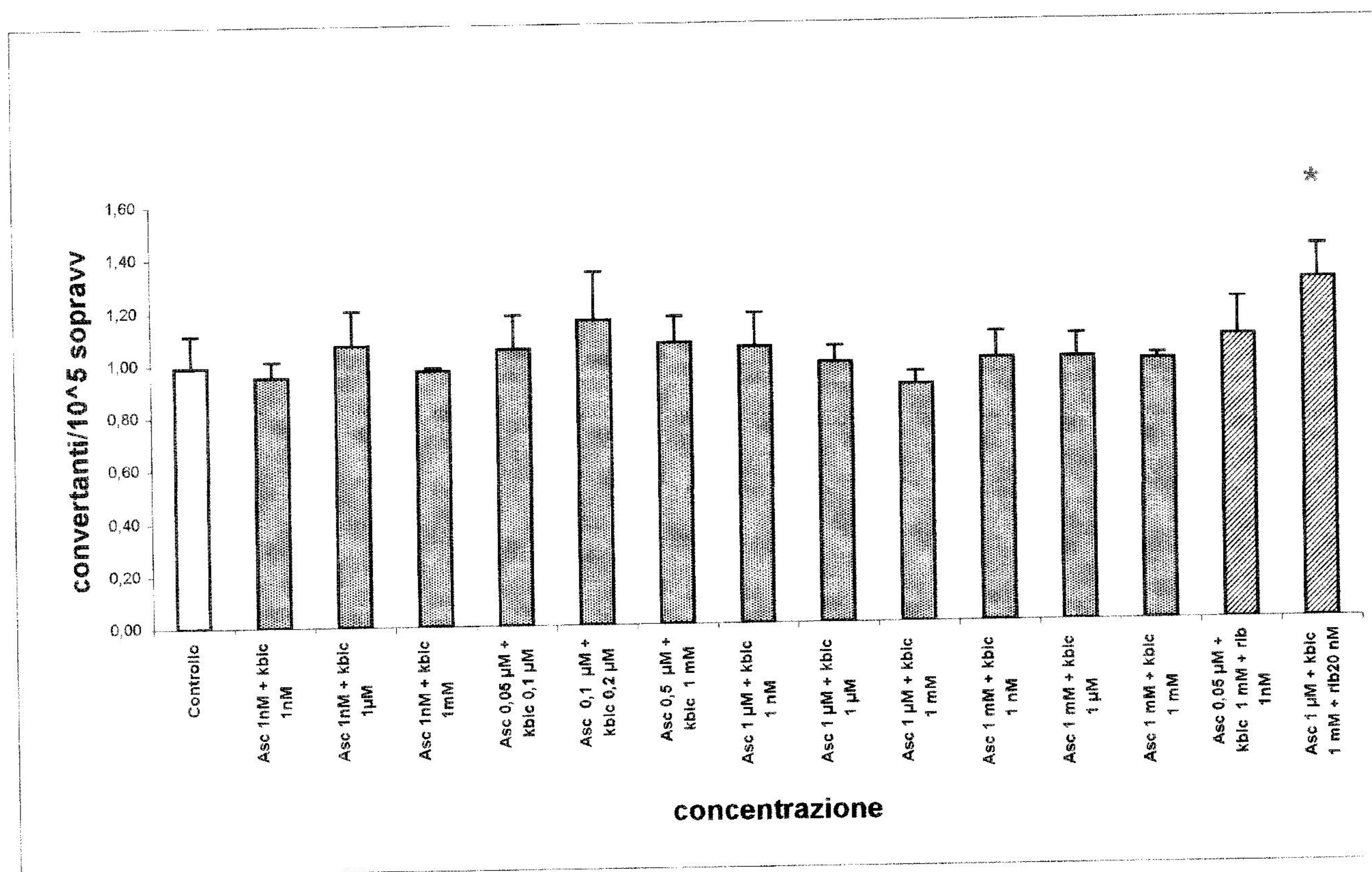


Fig 10: Effetto dell'acido ascorbico (Asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato di potassio (kbic), saggiati in combinazione, sulla conversione genica, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

Kbic 1nM+ rib 1 mM: non hanno avuto alcun effetto

Kbic 1mM+ rib 1 nM: non hanno avuto alcun effetto

* Aumento significativo rispetto al controllo

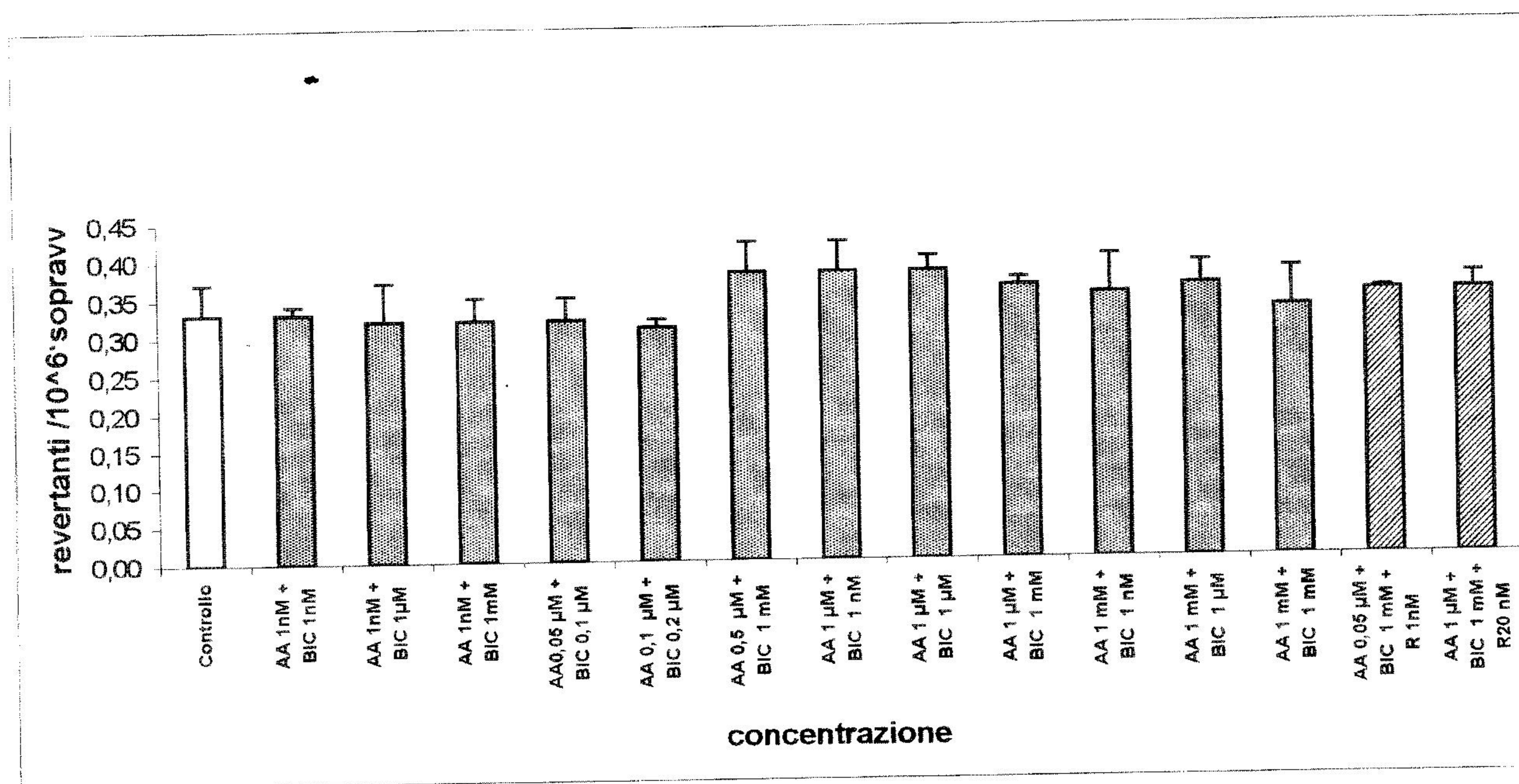


Fig 11: Effetto dell'acido ascorbico (Asc) del ribosio (rib) e del bicarbonato di potassio (kbic), saggiati in combinazione, sulla mutazione puntiforme, in cellule del ceppo D7 di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, prelevate dalla fase stazionaria.

Kbic 1nM+ rib 1 mM: non hanno avuto alcun effetto

Kbic 1mM+ rib 1 nM: non hanno avuto alcun effetto

CONCLUSIONI

In questo lavoro ci siamo proposti di indagare gli effetti genotossici ed eventualmente antimutageni dei composti:

- ascorbato di potassio
- ascorbato di potassio con ribosio

utilizzando il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, che costituisce, come già ripetuto durante il corso della relazione, un modello genetico rapido e poco dispendioso per cercare di individuare i potenziali effetti tossici di determinate sostanze. I risultati ottenuti indicano che:

1. i componenti acido L-ascorbico e bicarbonato di potassio non sono risultati genotossici e mutageni in esperimenti in sospensione;
2. l'ascorbato di potassio non è citotossico e mutageno in tutto il range di concentrazioni saggiate e sulla base di questi dati, potrebbe anche avere effetti positivi su cellule che sono state danneggiate;
3. l'ascorbato di potassio con ribosio al 2%, si è rivelata una combinazione con effetto protettivo, cioè in grado di proteggere le cellule dalla citotossicità causata dal perossido d'idrogeno, anche quando mancano entrambe le SOD.

Questi risultati dunque confermano le premesse del nostro studio, anche se saranno necessario ulteriori indagini per approfondire l'argomento ed identificare le potenziali caratteristiche antimutagene dei composti, anche a concentrazioni più elevate rispetto a quelle che sono state utilizzate in questo lavoro.

RINGRAZIAMENTI

Questa ricerca è stata svolta grazie al finanziamento della Fondazione Valsè Pantellini, per un Assegno di Ricerca conferito alla dott.ssa Clara Maria Della Croce, nell'ambito della collaborazione esistente tra la suddetta Fondazione e *l'Istituto di Mutagenesi e Differenziamento (CNR) di Pisa.

*Durante l'anno 2002 il personale dell'Istituto di Mutagenesi e Differenziamento (CNR) di Pisa, a causa del processo di riorganizzazione del CNR, è afferrito ad altri organismi del CNR, tra cui l'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA).

HYPERFINE INTERACTIONS (C)

Proceedings of the International Conference
on the Applications of the Mössbauer Effect,
(ICAME 2001) September 2-7, 2001, Oxford, U.K.

Edited by

Michael F. Thomas

Department of Physics,
University of Liverpool,
Liverpool, U.K.

John M. Williams

Department of Physics,
University of Sheffield,
Sheffield, U.K.

And

Terence C. Gibb

Department of Chemistry,
University of Leeds,
Leeds, U.K.

POTASSIUM ASCORBATE AS PROTECTIVE AGENT IN THE OXIDATION OF THE RED BLOOD CELLS

S. Croci_, G. Pedrazzi_, G. Paoli_, D. Monetti_, I. Ortalli_

1-Istituto di Scienze Fisiche, University of Parma, INFN-Udr Parma, Via Volturno 39 Parma, Italy

2- Fondazione Internazionale Valsè Pantellini per la Ricerca e lo Studio delle Malattie Degenerative, Firenze

Free radicals and oxidative substances are involved in many degenerative diseases modifying cell physiological properties. Many mechanisms can be disrupted, including the K-Na channels, with a consequent potassium loss. Free radicals are also able to modify erythrocytes stability leading peroxidation of the lipid membrane, oxidation of haemoglobin (Hb) and finally to the formation of Heinz Bodies. Such a process can also be induced or enhanced by strong oxidants like acetylphenylhydrazine (APH). In the present work the antioxidant properties of potassium ascorbate acting on the red cells treated with APH are investigated.

1. Introduction

Oxidative processes are involved in many degenerative diseases leading to various cell modification. Recognised facts that deserve particular attention are the oxidant action exhibited by free radicals (FRs), that is involved in Promoting and developing cancer [1-3], and the potassium loss from the cell with the consequent alteration of Na-K pumps. The loss of potassium is strictly connected with apoptosis ([4] and references therein). At normal intracellular K⁺ concentration, about 140-150 mM, the apoptotic mechanisms are dormant due to the inability to activate key protease and nuclease enzymes involved in the apoptotic process. The ubiquitous occurrences of such processes in living cells and tissues makes reasonable to extend the previous considerations to the red blood cells. Due to their systemic character the erythrocytes circulating in the blood stream can reach all the organs and undergo FRs actions. The erythrocytes stability can be reduced by peroxidation of the

lipid membrane and oxidation of the hemoglobin (Hb). The Hb oxidation processes starts with the information of methemoglobin, continue until endoerythrocytes inclusion called Heinz Body are formed inside the red cell, and ends with the release of hemin [2, 5]. This oxidation pathway can also be induced or enhanced by a strong oxidant like acetylphenylhydrazine (APH). In the present work we are interested in examining the effects of potassium ascorbate (K-asc) on APH treated erythrocytes collected from healthy volunteers using Mössbauer spectroscopy.

2. Material and Methods

The samples were prepared from venous blood taken from healthy volunteers. Five heparinized tubes (5 ml of blood each one) were collected from each person. One of the five tubes was used as control (C), the other four were incubated in a 30 mM APH solution in Sörensen buffer (pH=7.6), with the following procedures: in the first sample (APH50) 5 ml of whole blood were incubated for 50 minutes with APH; in the second (ASC50), third (K50) and fourth sample (KASC50), 5 ml of whole blood were added to APH and mixed with a solution of ascorbic acid, potassium bicarbonate and potassium ascorbate (K-asc), respectively.

K-asc is a salt resulting from the salification of ascorbic acid by potassium bicarbonate, and has antioxidant properties. In this preliminary work the K-asc concentration is based on the potassium concentration present in the cell at physiological condition. Ascorbic acid, potassium bicarbonate and potassium ascorbate were diluted in distilled water to prepare the solutions.

At the end of the incubation time, the samples were centrifuged for 10 minutes at 3000 RPM (~1500 g). After removal of the supernatant the cells were resuspended in 0.9% NaCl solution and centrifuged again at 3000 RPM for 10 minutes. The procedure was repeated twice. The packed red cells obtained from the last centrifugation were collected in a Mössbauer sample holder and immediately frozen in liquid nitrogen.

The measurements were performed at 77K with a conventional Mössbauer spectrometer (Takes inc.) working at constant acceleration (drive form Wissel Instruments) in transmission mode. The source was $^{57}\text{Co}/\text{Rh}$ with an activity of 3.7 GBq (100 mCi).

3.Result and Discussion

The antioxidant action of potassium ascorbate was followed during the incubation with the strong oxidant APH in various environment. Since K-Asc in the reaction product of ascorbic acid (Asc) and potassium bicarbonate (K), the K50 and ASC50 samples were also prepared, as reported in materials and methods section, in order to observe the action of the two substances separately. Mössbauer spectra revealed that only oxy-Hb and deoxy-Hb, as expected, are present in the spectrum of the control sample (C-figure 1). The spectra of the treated samples (figure 2) show the disappearance of the deoxy-Hb subspectra and the formation of a new component characteristic of oxidation products like methaemoglobin and haemichromes.

The increase of this latter oxidation component corresponds to a decrease of the oxy-Hb component (APH50, figure 2A). All the Mössbauer spectra were fitted with two subspectra obtained from the characteristic parameters of oxy-Hb and deoxy-Hb (figure 1) and from oxy-Hb and the envelope of all the oxidation products (figure 2) [5].

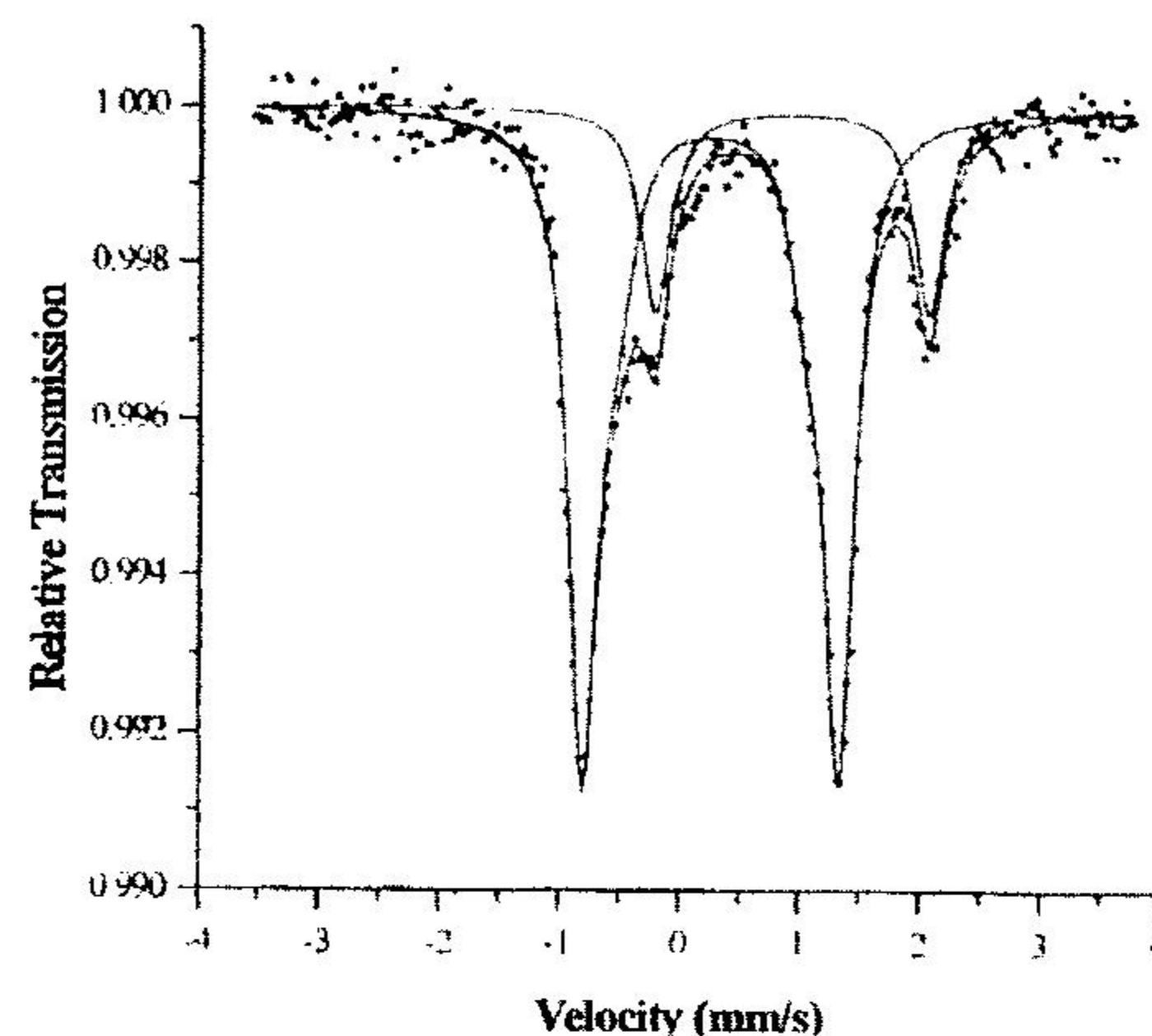


Figure1. Untreated erythrocytes (Control): oxyHb and deoxyHb subspectra are indicated.

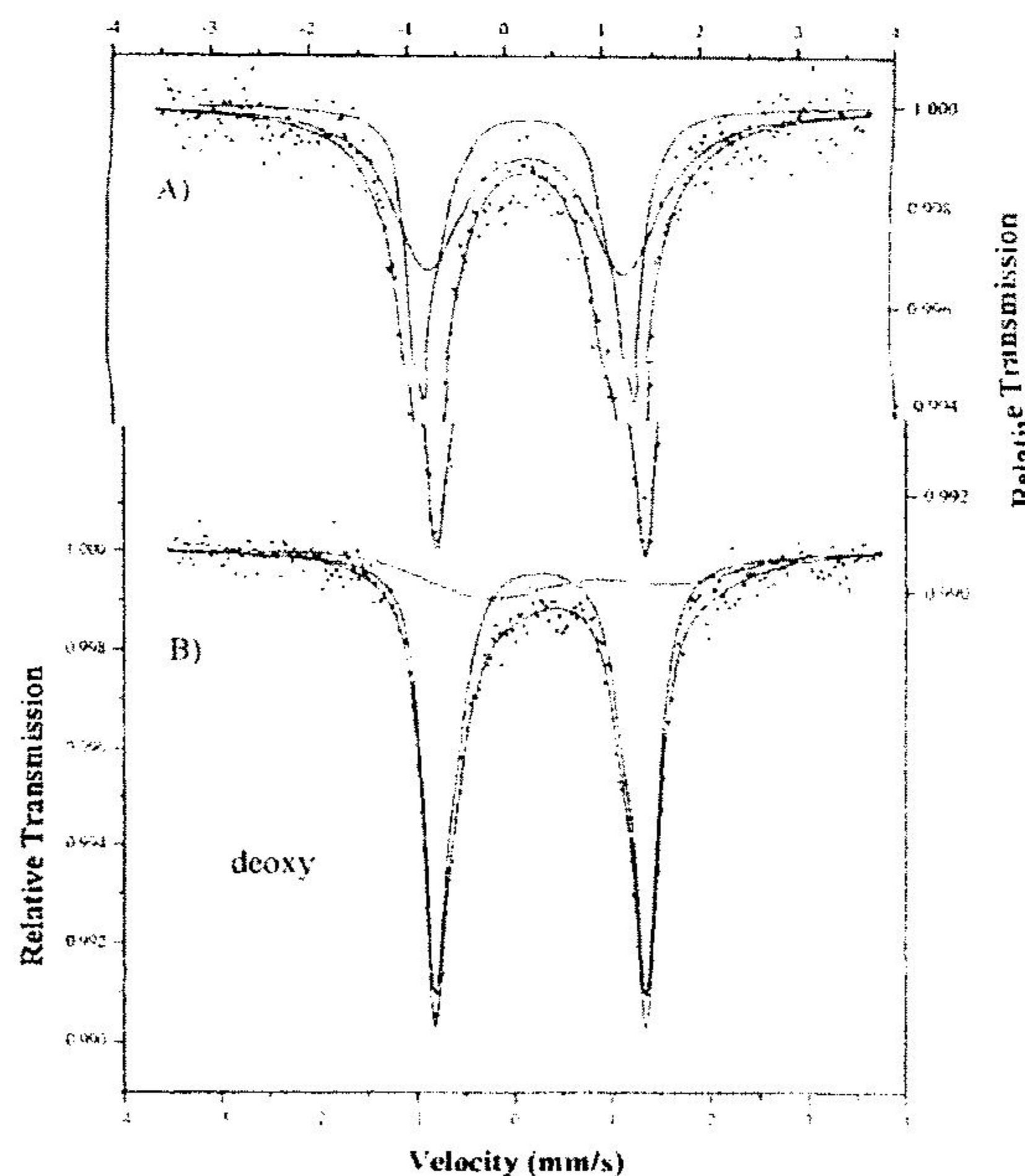


Figure2. Red cells incubated with APH for 50' (A); red cells incubated with APH and potassium ascorbate for 50' (B).

As it can be noted from figure 2b that represent the spectrum of KASC50, the oxidation pattern is almost completely absent when K-Asc is mixed with the APH added blood samples. This fact indicates a strong antioxidant behaviours of this compound.

It can be calculated that the relative amount of oxidation components is about 60% after 50 minutes of incubation with APH, while in

the KASC50 sample the action of potassium ascorbate reduces the oxidation to about 20%. The percent area of the oxidation product of all the samples (figure 3) confirms once more the antioxidant behaviour of ascorbic acid (Vitamin C). Our results show that potassium ascorbate too as antioxidant behaviour, together with the ability to carry potassium inside the red cells. As reported in [6], in fact, ascorbic acid bound K^+ can be transported across the membrane maintaining the physiological potassium concentration.

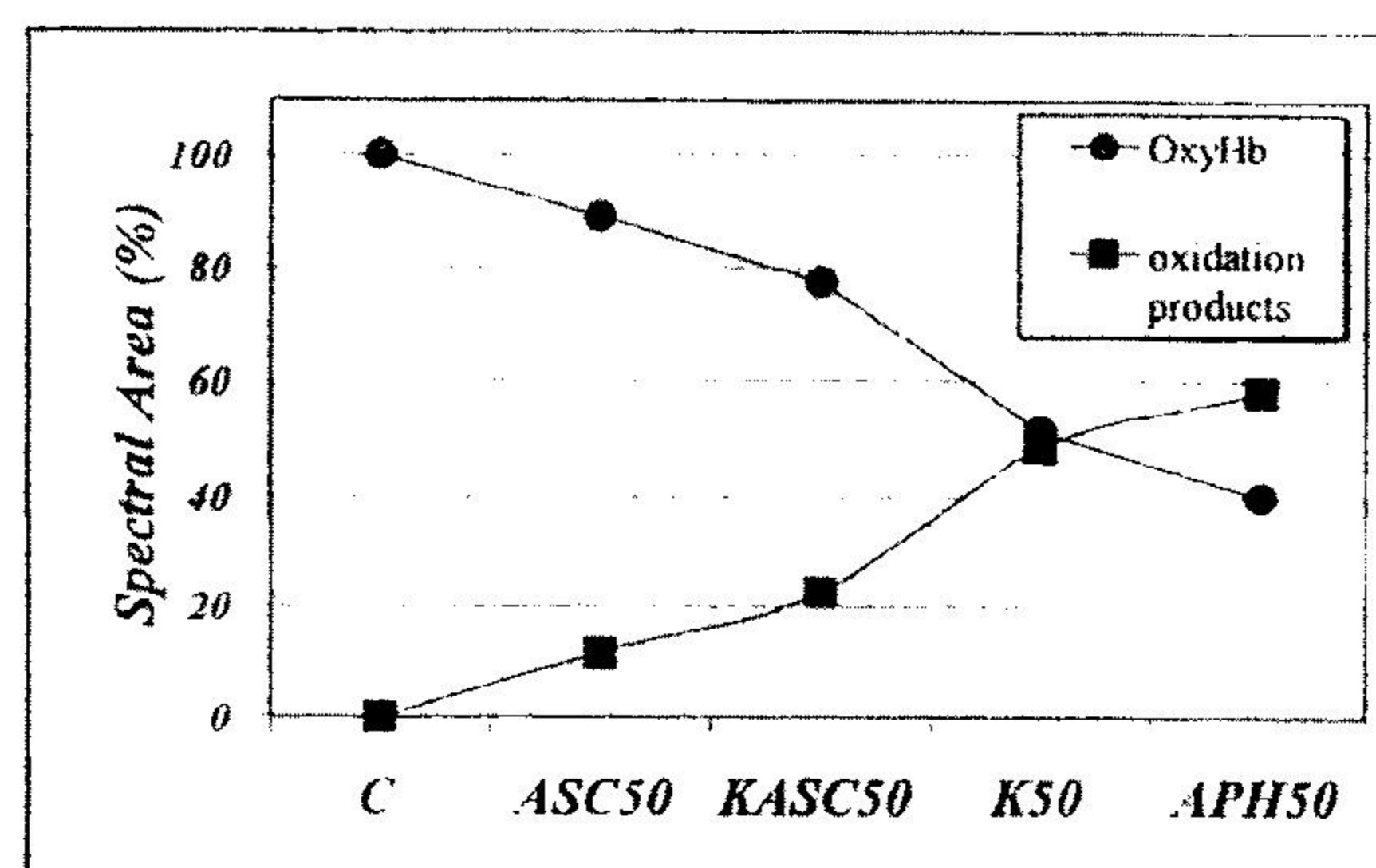


Figure3. Oxidation products in the erythrocyte samples after 50 minutes incubation with APH alone (APH50) and together with ascorbic acid (ASC50), potassium ascorbate (KASC50), potassium bicarbonate (K50).

References

- [1] M.R. Clemens, Klein. Wochenschr 69 (1991): 1123-1134;
- [2] P.Jarolim, M.Lahav, S.C. Liu, J. Palek, Blood 76 (19990) : 2125-2131
- [3] B. Halliwell, Nutr Rev. 52 (1994) 253-265 ;
- [4] F.M. Hughes Jr. C.D. Bortner , G.D. Purdy , J.A. Cidlowski. J. Biol. Chem.272 (1997) 30567-30576
- [5] S. Croci, I. Ortalli, G. Pedrazzi, G. Passeri and P.Piccolo. Hyperfine Iteration 126 (2000): 47-51
- [6] W. Lohman, Biophys-Struct-Mech. 184; 10(4):205-10



INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH

ABSTRACTS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANTIOXIDANTS IN CANCER PREVENTION AND THERAPY

4-7 June 2001, Athens, Greece

Organizing Committee

J. Ananatassopoulou, Athens, Greece
A.I. Constantinou, Chicago. IL , usa
G. Deliconstantinos, Athens Greece
I. Ember, Pecs. Hungary
A. Evangelou, Ioannina, Greece
N. Getoff, Vienna, Austria
H.E. Kaiser, Baltimore, MD. USA
A.K.M. Shamsuddin, Baltimore. MD, USA

I. Kiss, Pecs, Hungary
P. Pantazis, Providence, RI USA
G. Rebel, Strasbourg, France
K. Schultze-Osthoff, Münster, Germany
J. Spyrou, Stockholm. Sweden
Th. Theophanides, Athens. Greece
D. Galaris, Ioannina, Greece

_IST National Institute for Cancer Research, Biotechnology, Satellite Unit, Bologna; _Department of experimental Pathology, Section of Cancerology, University of Bologna; _' _Viale Filopanti 20/22-40126 Bologna, Italy.

99

POTASSIUM ASCORBATE AS PROTECTIVE AGENT IN OXIDATION OF RED CELLS

S. Croci_, G. Pedrazzi_, G. Paoli_, D. Monetti_, G. Bronzetti_, I. Ortalli_

_Istituto di Scienze Fisiche, University of Parma, INFN-UdR, Parma, Via Volturno 39, Parma, Italy.

_Fondazione Internazionale Valsè Pantellini per la Ricerca e lo Studio delle Malattie Degenerative, Firenze, Italy.

_Istituto Mutagenesi-CNR, Pisa, Italy.

The systemic action of oxidative substances, like free radicals or other chemical agents are involved in many degenerative diseases. Potassium ascorbate (K-ascorbate) is indicated to have anticancer properties through antioxidative mechanism, equilibrating potassium exchange. To study this agent, we followed its behaviour as antioxidant agent from a toxicological and genotoxic aspect. The results from these studies will be useful for a possible clinical application of K-ascorbate. Toxicology and genotoxic studies were performed using mutagenicity short-term test with respect to international criteria guide. Experiments were performed using *Saccharomyces cerevisiae* D7 strain. This strain allows evaluating three genetic effects such as mitotic gene conversion; mitotic cross over and point reverse mutation of adenine, tryptophane and isoleucine genes. The study was performed considering ascorbate, potassium bicarbonate and D-Ribose that are used to obtain the final compound K-ascorbate. Ascorbate was examined at the concentration of 10 mM, 1mM and 0.1 mM. D-Ribose was investigated at 0.1 mM to 10 mM. Same concentrations of Potassium bicarbonate (10 mM, 1.0mM and 0.1 mM) were used. The results showed that all compounds used did not induce any toxicity even at the higher concentration (10mM) used. Ascorbate, D-Ribose and Potassium bicarbonate, in addition, did not induce any genetic effects. A study is in progress to evaluate the antimutagenicity effect of Potassium Ascorbate.

Due to the correlation between oxidant agents and carcinogenesis, the capability of K-ascorbate to act as a protective agent against oxidation, has been tested on the red cells. The oxidant agents are able to modify erythrocyte stability leading to peroxidation of the membrane lipids, oxidation of the erythrocyte haemoglobin (Hb) and finally to the formation of endoerythrocyte inclusions called Heinz Bodies. This process can also be induced or enhanced by the action of a strong oxidant like acetylphenylhydrazine (APH). The samples used in this study were obtained from healthy people. Aliquots of venous blood, about 20 ml per person, were incubated with APH and K-ascorbate for various time intervals with different sequences. After centrifugation and separation from plasma, the erythrocytes were finally analysed by Mossbauer spectroscopy in order to estimate the capacity of K-ascorbate to neutralise APH action. Comparison of the cases where APH and K-ascorbate are acting together or in sequence are presented; moreover the antioxidation action of ascorbic acid alone confirmed.

It comes out clearly from Mössbauer spectra, that the oxidation products are reduced from 60%, produced after an incubation of 50 min with APH, to about 20% when K-ascorbate is present in solution together with APH. The presented results show that K-ascorbate, in addition to the drastic reduction of the oxidation products, can carry the potassium inside red cells to re-stabilise the correct ionic concentration.

PROCEEDINGS OF ICMAA-VIII

**(EIGHTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON MECHANISMS
OF ANTIMUTAGENESIS AND ANTICARCINOGENESIS)**

Pisa, Italy, 4-8 October 2003

**Edited by Giorgio Bronzetti (Chair of the Organizing Committee), Lynette R. Ferguson
and Silvio De Flora (Co-Chairs of the Scientific Program Committee)**

PROTECTIVE EFFECT OF POTASSIUM ASCORBATE IN DIFFERENT STRAINS OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Clara Della Croce¹, Giampaolo Poi¹, Leonardo Caltavuturo¹, Marco Badi², Guido Paoli² and Giorgio Bronzetti¹

¹Institute of Biology and Agricultural Biotechnology (IBBA)-CNR Research Area, Pisa, Italy (.cnr.it), and ²International Foundation Valsè Pantellini for Research and Study of Degenerative Pathologies, Firenze, Italy (.org).

It was well demonstrated that mutagenesis is strictly related to the processes of carcinogenesis and aging, and to the beginning of several diseases and syndromes. The identification of antimutagenic compounds can be very useful to prevent those phenomenons. Potassium ascorbate derives from ascorbic acid (vitamin C) and potassium bicarbonate melted together in a water solution. Ascorbic acid play an essential role as cofactor in several biochemical reactions, such as biosynthesis of collagen, steroid hormones and some aminoacids, and it is also involved in the metabolism of iron. Potassium is an essential element for life; it is the predominant positive electrolyte inside cells, where it regulates the osmotic pressure and the action of several enzymes. In addition potassium is important for the neuromuscular excitation and for the right working of kidneys, heart and brain. Potassium ascorbate is used in some experimental therapies for terminal patients with gastric cancer, but the mechanism of its protective effects is still not well understood. The aim of this work was to investigate the action of this salt on cells belonging to different strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The first step of this study was the analysis of the genotoxicity of potassium ascorbate in the D7 strain. The salt did not show any genotoxic effect in every type of experiments in which it was tested (at concentration of single component ranging from 1 μ M to 10 mM).different tests of antimutagenesis were performed, using hydrogen peroxide and acetylphenylhydrazine (APH) as mutagens. Both these compounds produce free radicals in yeast cells, leading to cellular damages and mutations, it it know that free radicals can interact with DNA and produce mutations. In different experimental conditions, potassium ascorbate reduced significantly frequencies of gene conversion and point mutation and contrasted the toxicity of hydrogen peroxide and APH in yeast D7 growing cells. Other experiments were performed by using four mutant yeast EG strains, characterized by deletions of genes codifying for superoxide dismutase (SOD), one of the important enzymes involved in free radicals detoxification. Potassium ascorbate showed protective effects also in growing EG cells treated with hydrogen peroxide. All data obtained in yeast suggest that potassium ascorbate has a protective effect on cells in oxidative stress conditions. It is possible to hypothesize that the chemotherapy action of this salt can be related to its antioxidant properties.

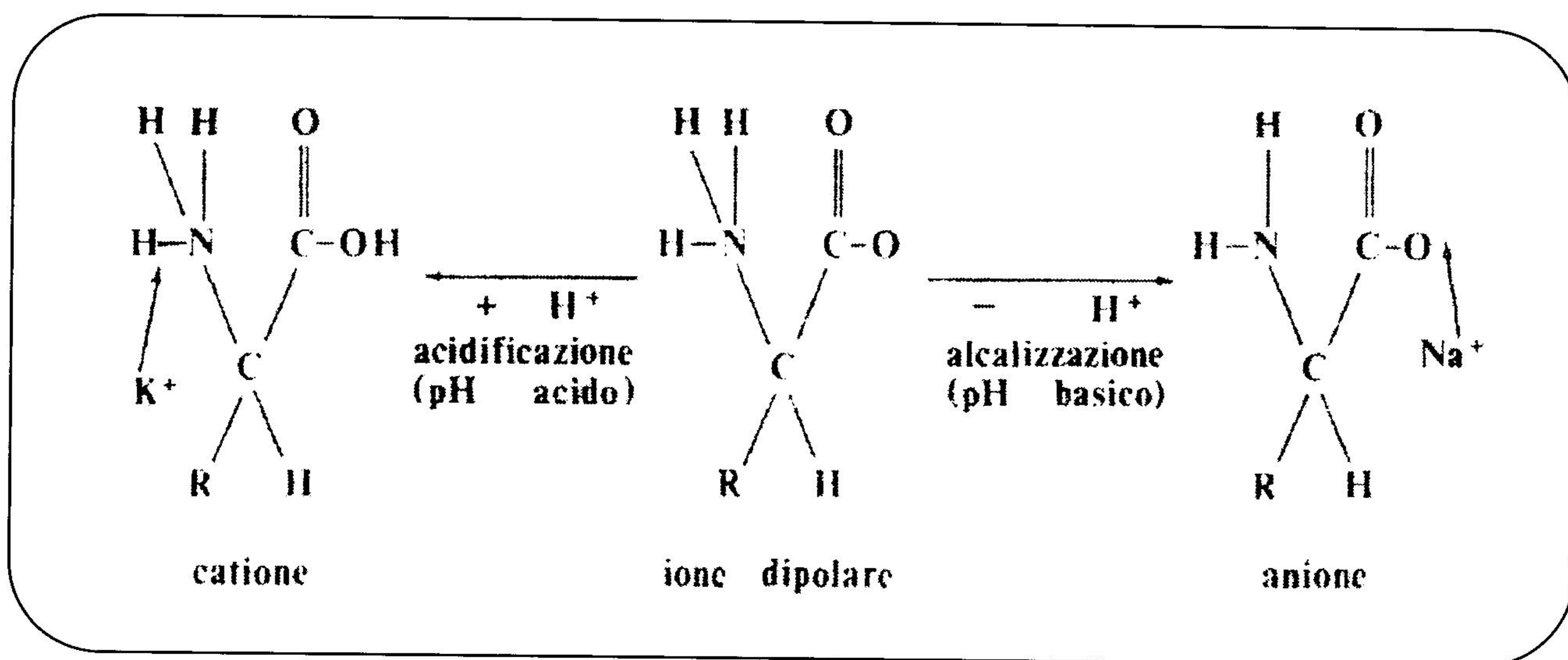
G. VALSE' PANTELLINI

**LEGAMI IDROGENO (H) E SALIFICAZIONE DEGLI
STESSI DA PARTE DEL POTASSIO (K) NELLA
STRUTTURAZIONE DELLA MATERIA VIVENTE**

In una mia pubblicazione sulla Rivista Italiana di Patologia e Clinica volume XXV n. 5, maggio 1970 ed. Maccari Parma " Breve cenno sulla genesi dei tumori e sopra una eventuale terapia dei medesimi con sali di potassio e in particolare con ascorbato di potassio " rendevo noto il meccanismo fisico-biologico della salificazione reversibile fra le basi proteiche e gli immino ed ammido gruppi NH NH_2 e il catione rappresentato unicamente dal potassio.

L'equazione chimica del meccanismo in questione è estremamente semplice e segue le leggi della chimico-fisica classica. Si può con sicurezza affermare che nelle strutture fondamentali dei DNA-RNA i gruppi idrogeno delle basi sono esclusivamente salificati dal potassio e questo in virtù della affinità chimica che si lega il potassio ai gruppi idrogeno.

Relazione presentata all'XI° Congresso Internazionale del Cancro – Firenze 20-26 ottobre 1974
Sala N. B/9: Presidente: Prof. P. Brookes (U.K.); Vice Presidente: R.E. prof. Handschmacher /USA
Segretario: Dr. M. Farmaro (Italia).



Infatti l'unica salificazione possibile dei gruppi NH₂ e NH delle basi legati ad elementi proteici senza che si abbia una trasformazione dei medesimi o una degenerazione è possibile solamente se questi vengono salificati dal potassio ione (K⁺).

La salificazione è reversibile (effetto Ciamician) la stabilità delle strutture biologiche e dei legami all'idrogeno che la compongono è direttamente legata alla presenza del catione potassio all'interno della cellula. Nel 1932 *Moravek* e *Kishi* in una serie di pubblicazioni misero in evidenza l'alta presenza di potassio all'interno della cellula in normale attività fisiologica, contemporaneamente notarono il contenuto di potassio nel tessuto neoplastico e nei tessuti non neoplastici dei portatori di tumori maligni e in particolare all'interno della cellula dei medesimi.

I valori trovati sono i seguenti:

- tessuto sano 290 mg. %
- tessuto neoplastico in via di sviluppo 50 mg. %
- tessuto neoplastico altamente sviluppato 25 mg. %
- tessuto neoplastico fase terminale 5 mg. e 0 mg. %

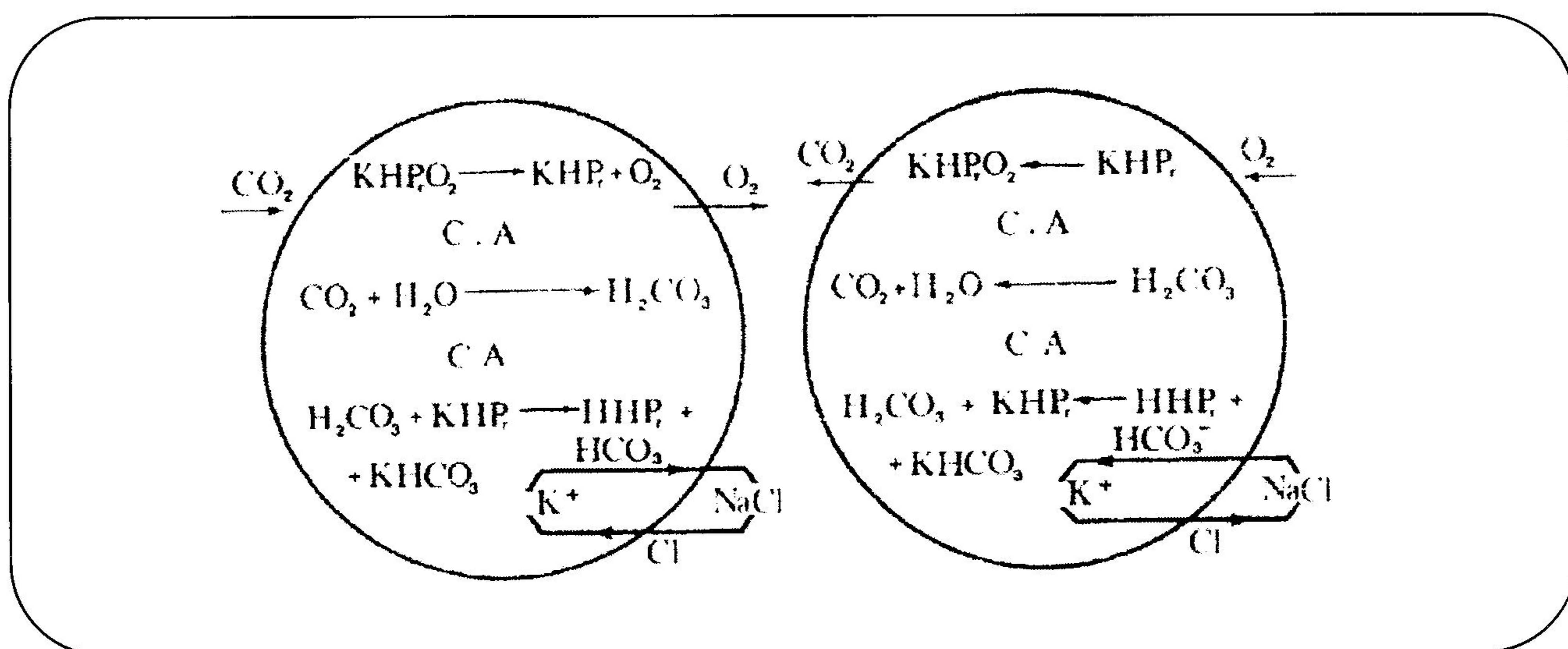
Contemporaneamente nei tessuti in esame viene ampiamente sostituito il potassio dal sodio.

I lavori di *Moravek* e *Kishi* si limitarono pertanto alla sola constatazione che nei tumori e in particolare nel sarcoma di Rous il sodio sostituiva il potassio.

Gli autori non davano una spiegazione fisico-chimica del fenomeno e come questo venisse a prodursi. Faccio notare che questo accadeva nell'anno 1932 e cioè quando non si conoscevano

ancora le strutture submolecolari della cellula. Bisognava giungere alla scoperta delle strutture primarie secondarie terziarie e quaternarie delle proteine degli enzimi del DNA RNA per poter intravedere l'importanza poi confermata dei legami a idrogeno.

Domandarsi come questi legami vengano a formarsi e quale sia il catione salificatore di questi legami a livello dei più importanti componenti biologici nella strutturazione degli stessi è valutabile nello schema qui rappresentato.



Tale schema indica il meccanismo ossido-riduttivo della reazione vitale il cui equilibrio è di importanza capitale per il normale funzionamento della cellula.

In linea di massima sappiamo che il catione sodio si trova essenzialmente nei liquidi pericellulari mentre il catione potassio è racchiuso per la maggior parte all'interno della membrana cellulare.

I due cationi rispetto alle proteine si comportano in modo diverso anche se apparentemente uguale rispetto alla salificazione dei seguenti gruppi COOH (gruppo carbossilico) e il gruppo NH NH₂ imminoammidico. Infatti mentre al di fuori della membrana le strutture proteiche vengono salificate dal sodio nel gruppo carbossilico all'interno delle cellule per un leggero spostamento del PH queste vengono salificate nei gruppi idrogeno delle basi stabilendo così solide strutture che servono alla edificazione dell'intera impalcatura cellulare.

Ciò che si verifica durante i processi ossido-riduttivi all'interno della cellula per mezzo del potassio ione si verifica anche all'esterno dei liquidi cellulari nei confronti del sodio ione, unica differenza è la quantità di energia meccanica e calorica che si sviluppa durante il processo ossido riduttivo presieduto dal sodio ione. È chiaro che anche le basi dei DNA e degli RNA vengano così salificate e così strutturate e che il potassio ione rimane il principale responsabile del mantenimento di queste strutture. Vi sono alcune proteine con strutture chimiche, come i composti eterociclici del pirrolo, che hanno solo una salificazione reversibile la salificazione potassica e rifiutano qualsiasi salificazione con altri cationi. Se tentiamo di salificare con sodio uno di questi composti si può avere l'apertura dei doppi legami di valenza fino ad arrivare alla formazione di prodotti aromatici (effetto Ciamician).

Tali tipi di salificazione possono dare inizio a processi di condensazione e di polimerizzazione fra i componenti.

È certo che la perdita del potassio endocellulare per motivi che ancora sfuggono comporti all'interno della cellula il verificarsi di formazioni polimerizzate fra loro con formazione di monomeri e di enzimi polimerizzanti (polimerasi) in particolare a livello degli RNA.

La formazione di questi polimeri fa sì che essi scarichino sul nucleo della cellula la loro energia di polimerizzazione (Forze di Van der Waals) provocandone una rapida divisione disordinata e monotona iniziando così il processo neoplastico.

È da pensare che l'insorgere di una neoplasia naturale sia dovuto in modo particolare alla sostituzione lenta all'interno della cellula del potassio da parte del sodio e che questo provochi con la sua attività chimica il formarsi lentamente in essa di composti policondensati polimerizzanti fra loro.

Un tal tipo di equilibrio chimico-fisico comporta la lenta difformazione di tutta l'informatica genetica con le conseguenze intuibili che si possono avere: tali reazioni devono avvenire all'interno del citoplasma cellulare e molto probabilmente fra gli RNA transferitori e la proteina da sintetizzare.

È certo che la perdita del potassio endocellulare per motivi che ancora sfuggono comporti all'interno della cellula il verificarsi di formazioni polimerizzate fra loro con formazione di monomeri e di enzimi polimerizzanti (polimerasi) in particolare a livello degli RNA.

La formazione di questi polimeri fa sì che essi scarichino sul nucleo della cellula la loro energia di polimerizzazione (Forze di Van der Waals) provocandone una rapida divisione disordinata e monotona iniziando così il processo neoplastico.

È da pensare che l'insorgere di una neoplasia naturale sia dovuto in modo particolare alla sostituzione lenta all'interno della cellula del potassio da parte del sodio e che questo provochi con la sua attività chimica il formarsi lentamente in essa di composti policondensati polimerizzanti fra loro.

Un tal tipo di equilibrio chimico-fisico comporta la lenta deformazione di tutta l'informatica genetica con le conseguenze intuibili che si possono avere: tali reazioni devono avvenire all'interno del citoplasma cellulare e molto probabilmente fra gli RNA transferitori e la proteina da sintetizzare.

È certo che una mancata e normale salificazione dell'informazione genetica da parte del potassio porta a cambiamenti di struttura nelle sintesi proteiche di portata inimmaginabile così come il rimando dell'informazione dall'RNA al nucleo della cellula viene ad essere sottoposto a forze di tensione nucleare (forze di Van der Waals) che ne provocano la rapida divisione con rapide e mostruose mitosi. Enuncio ora i quattro postulati che una futura verifica nel tempo mostrerà esatti:

- P. 1° -** Tutte le strutture viventi fondamentali sono costituite da legami idrogeno sia le strutture primarie, secondarie, terziarie e quaternarie.
- P. 2° -** I legami idrogeno sono elaborati dal catione potassio e da una quantità di energia radiante ad essi connaturalmente legata pari a 1.35 Mew con periodo di trasformazione di 1.3×10^{-10}
- P. 3° -** L'equilibrio fra legami idrogeno e cationi potassio salificanti è costante per ogni struttura vivente e diverso da struttura a struttura.
- P. 4° -** La mancata salificazione dei legami idrogeno da parte del catione potassio legato loro nella naturale strutturazione comporta la modifica di dette strutture per la apertura delle valenze delle basi e l'inizio di un processo di policondensazione e successiva polimerizzazione con particolare riguardo alla distorsione dell'informatica genetica, con formazione di nuove strutture anomale non compatibili con la vita (neoplasie).
In questo processo possono intervenire fattori concomitanti quali virus, tossine, stress, tossici, radiazioni e variazioni energetiche di natura chimico-fisica biologica.

La parte sperimentale e clinica verrà illustrata unitamente alla casistica dal collega e collaboratore Dr. Giovanni Orlandini a cui va tutta la mia riconoscenza.

RIASSUNTO

L'autore nel suo lavoro pone in evidenza l'importanza della salificazione del K^+ nella strutturazione dei legami idrogeno presenti nelle basi degli RNA e DNA e nelle complesse strutture proteiche della cellula. La salificazione è il presupposto fondamentale perché tali strutture si mantengano stabili ed inalterate nel tempo. La perdita del potassio endocellulare e la sua sostituzione con il sodio fa sì che questo ultimo stimoli l'apertura dei legami delle valenze delle basi (effetto Ciamician) alterando tutta l'informatica genetica e dando origine a forme polimerizzate nel citoplasma cellulare capaci di scaricare forze di tensione fisica (forze di Van der Waals) sul nucleo della cellula obbligando il medesimo a continue divisioni monotone con mostruose mitosi dando così origine ed inizio alla formazione della neoplasia. L'autore ritiene che il meccanismo chimico-fisico sia unico per tutti i tipi di tumore e che la variabilità degli stessi sia dovuta alle diverse sintesi proteiche operate nei vari RNA trasferitori presenti nei vari tessuti dei vari organi. Espone quindi i quattro postulati sulla strutturazione della materia vivente.

VALSE' PANTELLINI G.

FIRENZE

**BREVE CENNO SULLA GENESI DEI
TUMORI E SOPRA UNA EVENTUALE
TERAPIA DEI MEDESIMI CON SALI
DI POTASSIO E IN PARTICOLARE
CON ASCORBATO DI POTASSIO**

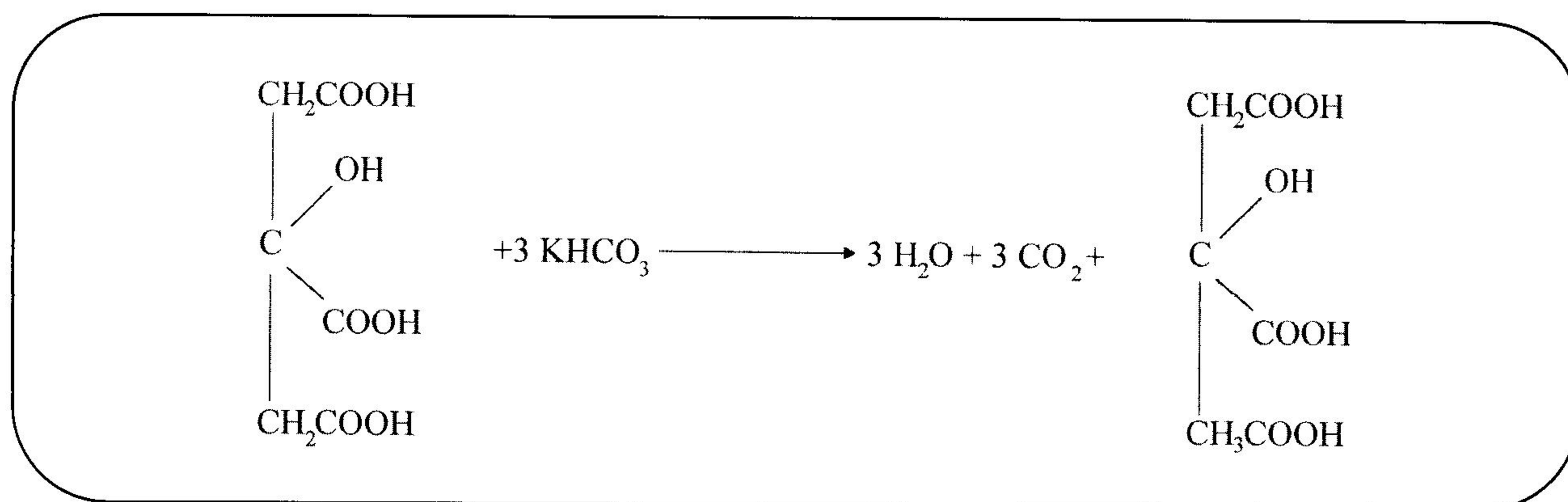
La mia ricerca ebbe origine fortuitamente. Un ammalato affetto da Cancro dello stomaco, dichiarato chirurgicamente inoperabile, ottenne sorprendenti benefici ingerendo limonate zuccherate in cui aggiungeva erroneamente Bicarbonato di Potassio (KHCO_3) invece dell'usatissimo Bicarbonato di Sodio (NaHCO_3). Il fatto mi meravigliò non poco, né potevo spiegare il perché la limonata così confezionata producesse un tanto benefico effetto.

Da tanto tempo si cercava e si ricerca tutt'ora una sostanza capace di svolgere un'azione efficace nella terapia del Cancro.

Tutti gli sforzi fino ad oggi compiuti sono risultati vani.

Iniziai una attenta indagine e principiai a salificare con Bicarbonato di Potassio i componenti del succo di limone.

In ordine di quantità il primo componente risulta l'Acido Citrico che riuscii a salificare con Bicarbonato di potassio e a cristallizzare sotto vuoto spinto previo allontanamento delle impurezze.

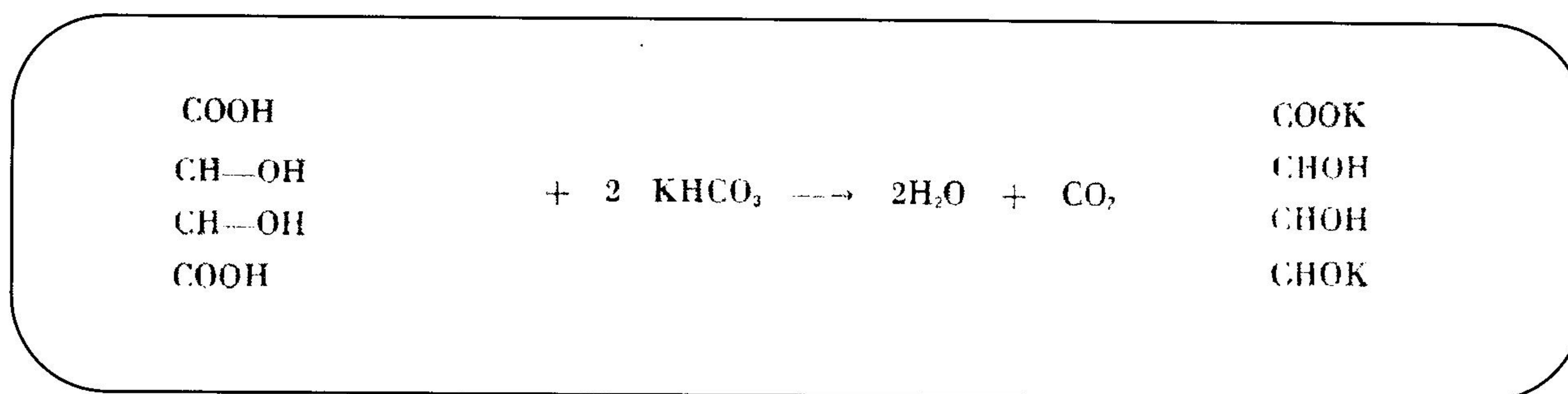


Mi assicurai dell'identità Chimica del prodotto ottenuto con quello chimicamente puro del commercio e misi in atto il primo esperimento.

In accordo con alcuni Colleghi Medici riuscii a mettere insieme quattro malati di Cancro già abbandonati al loro destino che volontariamente si offrirono di assumere per via orale il Citrato di Potassio in ragione di 1 gr. Al giorno, represso in 2 dosi di gr. 0,50 che, detti pazienti ingerivano sciolti in circa 25-30 cc. Di acqua _ d'ora prima dei pasti principali. Durante la Terapia fu continuata la comune somministrazione di ricostituenti generali; Analgesici, Analettici respiratori ecc. . . . Dopo 20 giorni di trattamento nessuno dei pazienti ebbe un miglioramento anzi, chi prima chi dopo accusarono diarrea e un aumento cospicuo della diuresi. Tutti i controlli risultarono nella norma del decorso del Morbo.

Il secondo componente contenuto nel succo di limone è l'Acido Tartarico.

Sottoposi anche questa sostanza a salificazione e a confronto di identificazione Chimica con il prodotto puro del commercio.



Somministravi a vari malati sempre nelle precedenti condizioni e con le stesse modalità della prima volta il Tartarato di Potassio in dose di gr. 0,90 represso in dosi di gr 0,45 sciolto in 25-30 cc. Di acqua _ d'ora prima dei pasti principali due volte al giorno. Dopo 20 giorni di trattamento non si notò nessun miglioramento né modifiche del Morbo.

Nel succo di limone rimanevano da salificare l'Acido Ascorbico e la Vitamina P (Esperidina + Eritrodietolo) quest'ultimo componente rilevabile in tracce tenuissime. Essendo queste due sostanze difficilmente estraibili e cristallizzabili dal succo di limone salificai l'Acido Ascorbico con prodotti puri del commercio forniti dalle case Roche, BDH, Merck, per il Bicarbonato di Potassio il prodotto è fornito dalla Casa Merck.

SALIFICAZIONE DELL'ACIDO ASCORBICO

L'acido Ascorbico salifica facilmente con Bicarbonato alcalini sciolti in acqua distillata a freddo e con Carbonati alcalino terrosi a caldo 45-50° e svolgimento di CO₂. per evaporazione a freddo sotto vuoto spinto si ottengono i sali cristallizzati (*Ascorbati*).

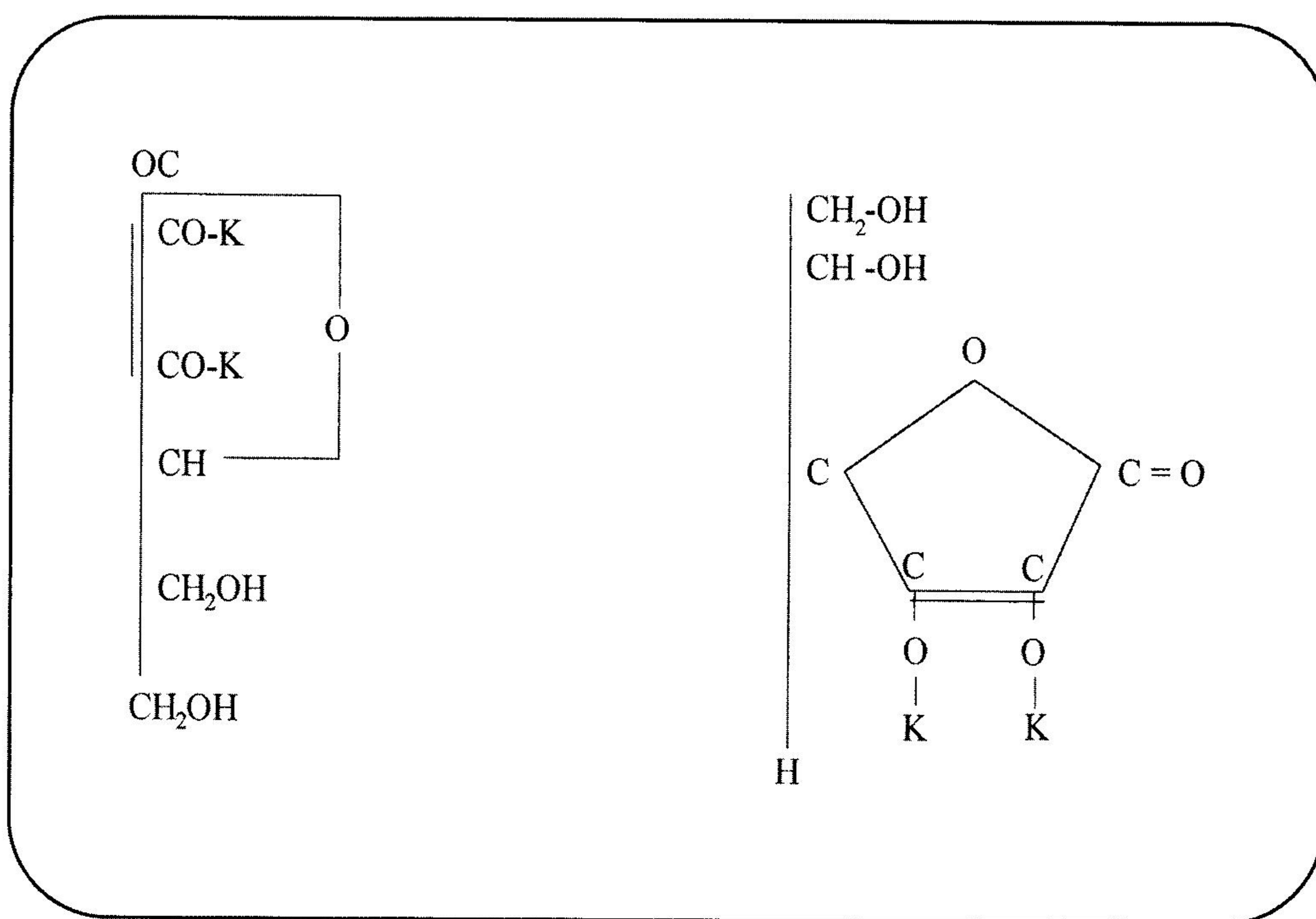
Per la Vitamina P (Esperidina + Eritrodietolo) non ritenni opportuno dare le tenuissime tracce presenti nel succo di limone eseguire delle ricerche sperimentali.

L'ASCORBATO DI POTASSIO

L'Ascorbato di Potassio è un sale bianco microcristallino facilmente solubile in acqua alquanto instabile per la sua facile ossidabilità. In soluzione, chiuso in fiale di vetro e sottoposto a pastorizzazione o sterilizzazione, si colora lentamente in giallo e poi bruno. La presenza di zuccheri fortemente riducenti prolunga la sua stabilità in soluzione.

L'Ascorbato di Potassio si ottiene per salificazione dell'Acido Ascorbico in soluzione acquosa a freddo. Evaporando sotto vuoto, lo si ottiene allo stato puro. In soluzione è poco dissociato. La soluzione ha sapore metallico ferroso come quella del sangue, non presenta nessuna tossicità e può essere usato per lungo tempo. segue Biologicamente il destino dell'Acido Ascorbico.

Come derivato dell'Acido Ascorbico può assumere due formule di struttura diverse. La forma Enolica e la forma Furanosica. Quest'ultima viene assunta quando detto sale si trova in soluzione.



Iniziai nelle medesime condizioni dei precedenti esperimenti la somministrazione dell'Ascorbato di Potassio a diversi malati di Cancro, somministrando a ciascheduno gr. 0,90 di Ascorbato di Potassio retrato in due dosi di gr. 0,45 due volte al giorno _ d'ora prima dei pasti principali. Nel giro di 19-20 giorni si manifestarono per la prima volta sintomi di miglioramento in modo più o meno evidente in tutti i malati. Ripresa delle forze, dell'appetito, diminuizione dei dolori, aumento di peso, normalizzazione della formula ematica. Alcuni malati migliorarono fino al punto da riprendere le normali occupazioni. Tale miglioramento durò per alcuni qualche anno per altri alcuni mesi poi gradatamente il male riprese la sua evoluzione fino all'exitus finale. Riferisco molto succintamente quanto da me e dai Sanitari che mi assistevano veniva constatato. Non porto statistiche e mi limito a considerare un fatto certo " La somministrazione di Ascorbato di Potassio migliora le condizioni generali di un malato di Cancro ".

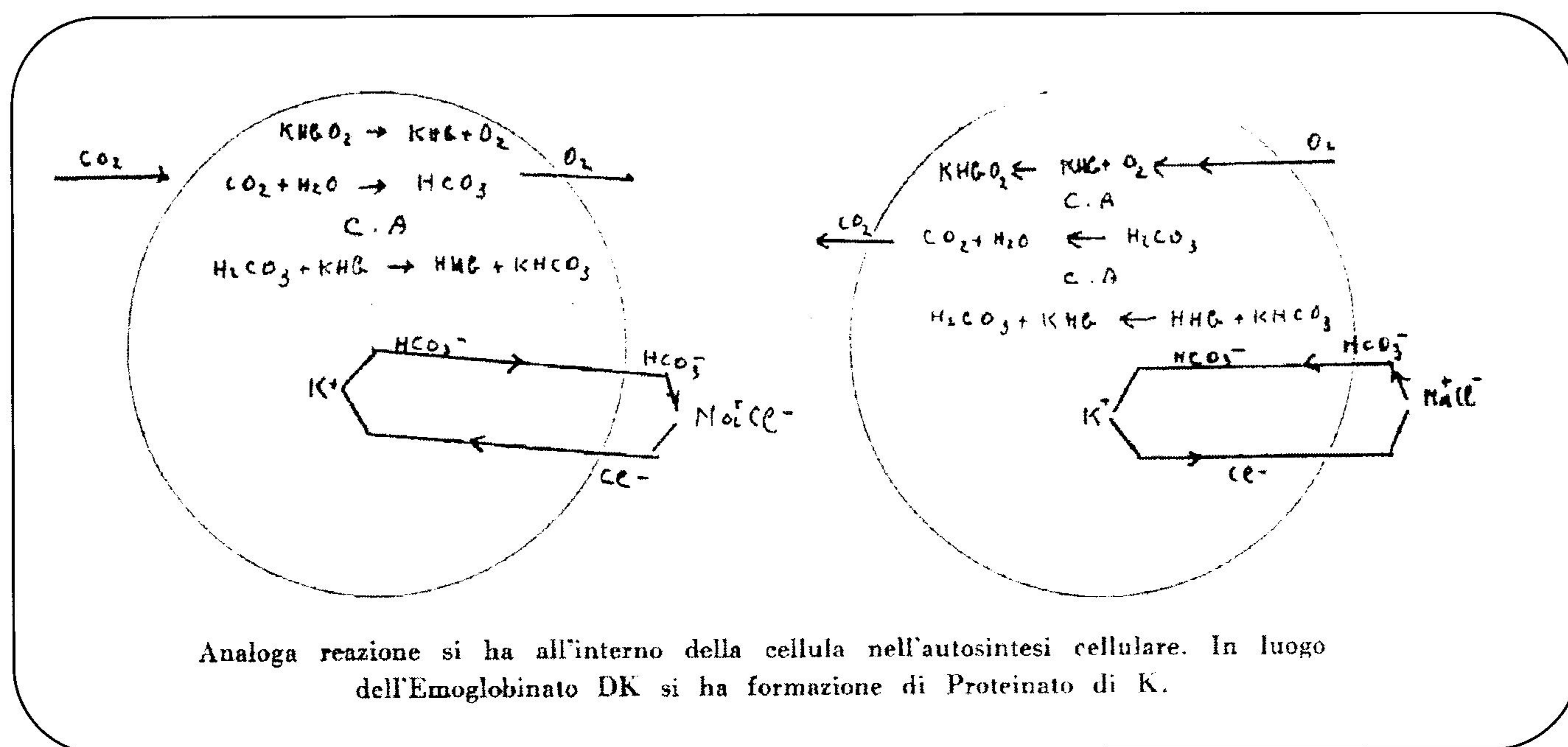
PROBABILE MECCANISMO D'AZIONE DELL'ASCORBATO DI POTASSIO

Risulta da una larga Bibliografia che il Catione K^+ si trova sempre all'interno della membrana cellulare dei tessuti e degli eritrociti sotto forma di Proteinato di Potassio e Emoglobinato di Potassio, mentre nei liquidi Pericellulari e nel siero è presente il Catione Na^+ (prevalenza netta). Questi due cationi sono Fisico-Chimicamente affini appartenendo allo stesso gruppo degli Alcalini e risultando in equilibrio reciproco nel nostro organismo per mezzo del meccanismo delle soluzioni tampone. Rimane però ancora oscuro perché il K^+ si trovi all'interno delle membrane (interfaces di separazione) e il Na^+ all'esterno di queste mentre gli anioni HCO_3^- , Cl^- , PO_3^- ecc., circolano liberamente nei due sensi senza nessun ostacolo di sorta. Tale meccanismo d'azione è regolato dalla attività di catalisi delle Carboanidrasi.

Per spiegare tale stato Fisico-Chimico dei due cationi non basta invocare fenomeni di pressione osmotica, né di PH né di pressione H (rH), né forze di equilibrio elettrostatico, né di potenziali di membrana. Ritengo personalmente che il fenomeno possa essere esattamente definito in senso strettamente chimico e cioè, che il potassio salifichi per la sua affinità chimica atomi di Idrogeno presenti nei gruppi di Amminoacidi all'interno delle cellule e degli Eritrociti cosa, che il sodio non può fare avendo minore affinità Chimica per detti gruppi idrogenati e quindi ne viene di conseguenza escluso. Si stabilisce così che, per affinità Chimica il Sodio presiede veramente nel siero e nei liquidi pericellulari alla riserva alcalina, mentre il Potassio per la sua affinità verso i gruppi idrogeno degli amminoacidi presenti all'interno delle membrane cellulari presieda attivamente ai fenomeni degli interscambi ossido-riduttivi dei medesimi, mantenendo costante la quota proteica necessaria a un'ordinata strutturazione del complesso edificio cellulare. Partecipa inoltre attivamente ai fenomeni respiratori della medesima. Lo schema qui allegato dà una visione esatta e chiara di questo fenomeno (1).

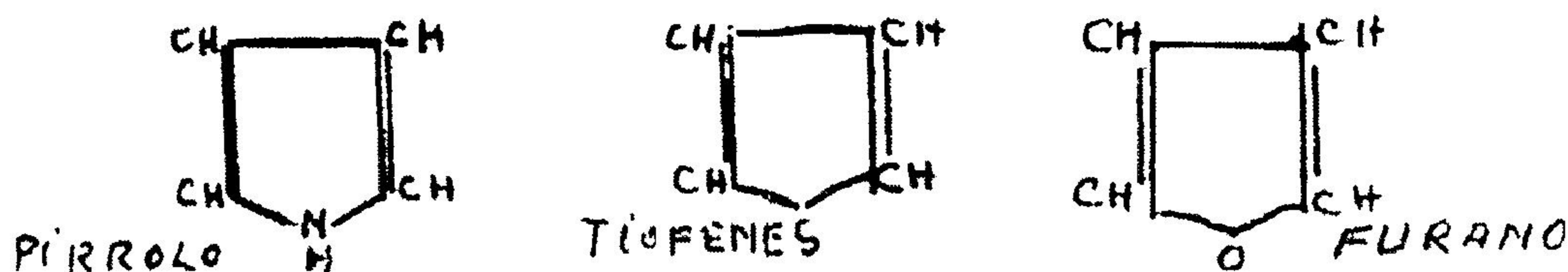
L'ANELLO PIRROLICO E LA SUA IMPORTANZA NELLA STRUTTURA DELLA MATERIA VIVENTE: SUE ANALOGIE CON L'ANELLO FURASICO E TIOFENICO

L'importanza dell'anello Pirrolico e le sue relazioni con molti prodotti fondamentali della vita animale e vegetale è fuori discussione. Tanto l'Emoglobina del sangue quanto la Clorofilla delle piante



Contengono nella loro molecola anelli pirrolici, così pure sono da considerarsi derivati del pirrolo molti amminoacidi fondamentali. E' anche importante, notare che i pigmenti neri animali, pelle, peli, ecc., hanno stretta parentela con i neri di pirrolo e ciò ci autorizza a formulare l'ipotesi che detti pigmenti siano composti ossidati e poli-condensati a struttura pirrolica.

Pirrolo, tiofene e furano sono analoghi e isologhi fra loro e seguono quindi nella formazione dei loro composti la regola delle analogie (Angeli). E' quindi logico pensare che durante i processi di sintesi Biologica dei derivati proteici di tali composti si svolgano reazioni chimiche-fisiologiche analoghe e che in certe particolari condizioni un gruppo pirrolico possa essere sostituito da un analogo gruppo tiofenico o furanico.



L'Emoglobinato di potassio e il proteinato di potassio contengono strutture pirroliche salificabili con KHCO_3 . Ora si dà proprio la combinazione che l'ascorbato di potassio possieda nella sua molecola un gruppo furanosico, il quale può sostituire per analogia uno dei gruppi pirrolici del proteinato del potassio o dell'emoglobinato di potassio. Tali gruppi sembrano sicuramente essere stati inattivati quando si inizia il processo di cancerogenesi.

È molto probabile che l'inizio della neoplasia abbia proprio per punto di partenza la molecola peptidica contenente gruppi pirrolici al livello dell'R.N.A.

Secondo la mia ipotesi l'apertura della molecola pirrolica (effetto Ciamician)

Può in particolari condizioni fisiologiche dare origine a un innesco di polimerizzazione dell'RNA e iniziare così la fase biologica della Neoplasia.

Iniziata la polimerizzazione l'andamento successivo delle reazioni metaboliche di assorbimento e di rifornimenti di energia del mezzo esterno pericellulare dell'unità biologica elementare assume un ritmo costante indefinito seguendo le leggi della polimerizzazione.

Nei tessuti si creano quindi monomeri polimerizzati fra i quali si stabiliscono forze fisiche di tensione (forze di Van der Waals) forze che sono molto diverse dalle comuni forze elettrostatiche.

Da qui l'inutilità d'interferire nell'evoluzione della neoplasia con sostanze Chimiche o Farmaci capaci di esplicare forze di natura elettrochimica che non potranno mai contrapporsi efficientemente alle forze di tensione fisica stabilitesi tra i vari polimeri della neoplasia.

CONCLUSIONE

Da quanto riferito nelle pagine precedenti ritengo che:

1° - L'azione specifica dell'ascorbato di potassio sia dovuta a detto catione salificato all'anello furanosico dell'acido ascorbico. Questo gruppo può sostituire egregiamente per analogia il gruppo pirrolico ritenuto inattivato e riportare quindi i fenomeni di strutturazione dell'auto-sintesi cellulare alla normalità fisiologica richiesta.

2° - L'energia di polimerizzazione a decorso monotono, presente nella fase neoplastica, venga interrotta per l'introduzione nella cellula del gruppo vicariante formato dall'ascorbato di potassio riportando l'equilibrio fra le forze intermolecolari dei gruppi peptidici presenti all'interno della membrana cellulare.

Convegno - Giornata di Studio - Terni 2010

"Ascorbato di potassio con ribosio: nuovi sviluppi nella ricerca su malattie degenerative, prevenzione della salute e nutraceutica"

Presentazione di casi veterinari nei quali è stato utilizzato l'ascorbato di potassio con ribosio

Dott.ssa Giulia Milesi

Libero Professionista in Medicina Veterinaria

Caso n.1: Gatto certosino, maschio, castrato di 11 anni (2007).

Fibrosarcoma vaccinale fra le scapole, dimensioni di una "grossa noce". Il proprietario, che sta già assumendo ascorbato di potassio con ribosio come prevenzione, decide di somministrarne due dosi al giorno anche all'animale insieme ad impacchi locali di calendula (Agosto 2007). Non viene somministrato nient'altro in quanto il gatto è refrattario ad altre sostanze. Ad Ottobre 2007 riduzione della massa alle dimensioni di una "nocciola". Ad Aprile 2008 si stabilizza sulle dimensioni di una "lenticchia". Follow up attuale: stabile.

Caso n.2: Cane dei Pirenei.

Osteosarcome nasale. Prendo in carico il cane quando è ormai a poche ore dall'eutanasia. Somministro: ascorbato di potassio con ribosio (3 volte al giorno), cortisone (2 volte), vitamine del gruppo B (2 volte), aloe (3 volte), amaro svedese (3 volte), antibiotico (2 volte). Immediato sollievo, fine delle perdite ematiche, diminuzione del gonfiore entro la prima settimana. Situazione stabilizzata dopo un mese. Remissione completa e terapia di mantenimento per 1 anno. Successiva recidiva; ripresa della terapia senza alcuna risposta. Eutanasia.

Caso n.3: Gatta "pulcina" di 15 anni

Tumore mammario con metastasi polmonari (lesione polmonare con nodulo con diametro di circa 1.5 x 1 cm). Somministro: ascorbato di potassio con ribosio, cortisone (per 1 mese), vitamine del gruppo B, aloe, applicazioni locali di amaro svedese e calendula. RX di controllo al 2° mese: riduzione e rarefazione del nodulo polmonare, stabilizzazione del tumore mammario. Continua assunzione con ascorbato di potassio e ribosio. Nel 2009 si ulcera il tumore esterno ma con RX stabile. Ad oggi, follow up: stabile.

Caso n.4: Mastino napoletano di 6 anni.

Osteosarcoma all'omero. Prendo il caso ai limiti dell'eutanasia; il cane non cammina ed ha smesso di alimentarsi, e sono presenti gonfiore ed ulcerazione dei tessuti molli. Contemporanea infezione batterica, Leishmania e Rickettsia in atto. Oltre alle terapie nspecifiche per queste due malattie somministro: ascorbato di potassio con ribosio, cortisone, vitamine del gruppo B aloe, viscum album, oltre ad applicazioni locali di calendula ed amaro svedese. Regressione totale della sintomatologia entro 20 giorni. RX di controllo verifica riduzione del 70% de tumore.

Stabile per 6 mesi. Il cane poi, improvvisamente, presenta sindrome paraneoplastica e muore in tre giorni per le conseguenze.

Caso n.5: Cane Bull Mastiff di 11 anni e mezzo.

Linfoma e leucemia eritroide in fase acuta con DIC (coagulazione intravasale diffusa). Vengono fatte trasfusioni in Pronto Soccorso. Somministro: ascorbato di potassio con ribosio, aloe, viscum album, cortisone, vitamine del gruppo B, amaro svedese, melatonina, omega 3. Alimentazione esclusiva a base di farro, pesce, maiale, patate. Inoltre terapia con vincristina(a basso dosaggio) e mostarde azotate (a basso dosaggio). Regressione totale della leucemia eritroide. Linfoma sotto controllo per 6 mesi, poi nuova esplosione della patologia con infiltrazione metastatica a livello dei reni e conseguente insufficienza renale. Eutanasia.

Caso n.6: Gatta di 15 anni.

Tumore alle cellule di transizione della vescia. Dopo la diagnosi (Ottobre 2009) somministro: ascorbato di potassio con ribosio, melatonina, adjuvant plus, viscum album. Attualmente stabile.

**"Ascorbato di potassio con ribosio:
nuovi sviluppi nella ricerca su malattie degenerative, prevenzione della salute e nutraceutica"**

**Ruolo dell'ascorbato di potassio con ribosio in pazienti con malattie genetiche rare associate
ad aspetti degenerativi ed aumentato rischio oncologico**

Dott.ssa Cecilia Anichini
Dipartimento di Pediatria, Ostetricia e Medicina della Riproduzione
Università degli Studi di Siena

Fin dal 1° Congresso della Fondazione Valsé Pantellini tenutosi nelle Asturie (Spagna) nel 2006 sono stati valutati gli effetti dell'ascorbato di potassio con ribosio in bambini aventi patologie genetiche associate ad un elevato rischio oncologico come le sindromi di Costello e di Wiedemann Beckwith e le collagenopatie come le sindromi di Marfan e di Ehlers Danlos. La predisposizione ai tumori include i neuroblastomi, i rhabdomyosarcomi, i tumori vescicali, i papillomi nasali. Lo studio è stato eseguito dalla Dr.ssa Cecilia Anichini del Dipartimento di Pediatria, Ostetricia e Medicina della Riproduzione dell'Università di Siena.

La produzione di elastina, maggiore componente delle fibre elastiche, può essere modulata da vari fattori e risente molto dell'azione degli elementi ossidanti (stress ossidativo), uno dei quali è il ferro non legato alle proteine (NPBI).

In considerazione di una correlazione inversa tra il contenuto di ferro intracellulare e la sintesi e deposito di tropoelastina è stato ipotizzato che interventi con agenti antiossidanti (somministrazione giornaliera di ascorbato di potassio con ribosio secondo lo schema Pantellini) possa avere un duplice effetto positivo sia sui depositi di elastina sia sul possibile rallentamento dell'insorgenza di neoplasie, interferendo sui markers di stress ossidativo.

Nel gruppo di bambini in esame, dopo un periodo di trattamento con ascorbato di potassio con ribosio, sono stati valutati, con cadenza trimestrale, i miglioramenti clinici, l'evoluzione di patologie cardiache (comprese le complicanze cardiovascolari, spesso letali) e addominali tramite ecografia e in alcuni casi RMN, lo sviluppo psicomotorio, il metabolismo osseo, i markers oncologici e le variazioni dei markers di stress ossidativo.

Nei bambini sottoposti a questa somministrazione giornaliera è stato osservato, dopo appena tre mesi di terapia, un netto miglioramento degli aspetti cutanei e un miglioramento dell'equilibrio ossido-riduttivo testato su sangue e urine, il che è di auspicio al proseguo di tale terapia. Inoltre, in pazienti con sindrome di Marfan è stato rilevato, già dopo tre mesi di terapia con ascorbato di potassio con ribosio, un miglioramento di certi aspetti come: capacità ventilatoria, stabilità degli aspetti cardiologici (aneurisma aortico) e incremento della densitometria ossea. A tutt'oggi non sono state evidenziate patologie oncologiche nei bambini seguiti.