

Valutazione degli effetti dell'assunzione di un'acqua bicarbonato-calcica iposodica in donne in pre- e in postmenopausa come prevenzione dell'osteoporosi

Responsabile dello studio: Prof. Luca Rastrelli, Professore Ordinario di Chimica degli alimenti, Dipartimento di Farmacia, Università degli studi di Salerno, Via Giovanni Paolo II, 132, 84084 Fisciano SA- Laboratorio di Ricerca Clinica Nutrizionale Universitario Nutriketo_Lab, Azienda Ospedaliera San Giuseppe Moscati, Contrada Amoretta, 83100 Avellino AV

Medico dello studio: Prof. Giuseppe Castaldo, Specialista in Medicina Interna, Gastroenterologia, Scienze dell'Alimentazione. Direttore scientifico del Laboratorio di Ricerca Clinica Nutrizionale Universitario Nutriketo_Lab, Azienda Ospedaliera San Giuseppe Moscati, Contrada Amoretta, 83100 Avellino AV

Indirizzo della struttura sanitaria: Laboratorio di Ricerca Clinica Nutrizionale Universitario Nutriketo_Lab, Azienda Ospedaliera San Giuseppe Moscati, Contrada Amoretta, 83100 Avellino AV

Sponsor dello studio: SGAM S.p.A.

1. Premessa

Un adeguato introito di calcio è necessario per il raggiungimento del picco di massa ossea e per il mantenimento delle densità minerale ossea in gravidanza, in menopausa e nell'anziano.

Quando, per uno stile alimentare non corretto, assumiamo livelli non adeguati di calcio, il nostro organismo interviene rimuovendolo dalle ossa.

Le acque minerali naturali con un alto livello di calcio possono rappresentare una significativa fonte di questo elemento.

L'intake giornaliero raccomandato di calcio oscilla tra 1000-1500 mg/die, a seconda della fascia di età e/o di particolari condizioni fisiologiche. In caso di carenza, risulta necessario intervenire con un'adeguata integrazione (*Panel 1994; Prince et al., 2006*).

Il metabolismo del calcio è regolato da tre principali meccanismi: assorbimento intestinale, assorbimento renale e turnover osseo, regolati da PTH (paratormone), vitamina D, calcio ionizzato e corrispondenti recettori.

Diversi studi epidemiologici hanno evidenziato che nella popolazione mondiale i livelli di introito di calcio alimentare non soddisfano i livelli raccomandati, particolarmente nelle donne in menopausa e negli anziani. La bassa assunzione di calcio si associa purtroppo spesso a un basso livello di vitamina D. Il risultato che si evidenzia è una diminuzione dell'assorbimento di calcio, con una sua diminuzione nel plasma e con conseguente attivazione del PTH e del turnover osseo (*Lombardi et al., 2011*). La conseguenza clinica più preoccupante è un aumento di rischio delle fratture dell'anca. Diversi studi hanno riportato che l'integrazione di calcio riesce a ridurre il turnover osseo e il rischio di fratture (*Ye et al., 2020*).

Le principali fonti alimentari di calcio sono il latte e i prodotti lattiero-caseari, i quali molto spesso non vengono consumati perché non ben tollerati da una fetta della popolazione, che soffre di problemi di intolleranza alimentare, o a causa del loro contenuto lipidico. Inoltre, l'integrazione di calcio con preparati farmaceutici non sempre è effettuata regolarmente e alcuni studi hanno evidenziato dei possibili problemi collaterali a livello cardiaco. Una fonte alimentare di calcio altamente biodisponibile è rappresentata dalle acque minerali naturali calciche, in particolare quelle bicarbonato-calciche.

In questo scenario si inserisce la sperimentazione clinica dal titolo "Valutazione degli effetti dell'assunzione di un'acqua bicarbonato-calcica iposodica in donne in pre- e in postmenopausa come prevenzione dell'osteoporosi", con l'obiettivo primario di valutare gli effetti del consumo di acqua ricca di calcio sul metabolismo osseo nelle donne in menopausa. L'acqua in questione selezionata per lo studio è l'acqua minerale effervescente naturale Lete che presenta un elevato contenuto di calcio (305 mg/L) (*Pagano et al., 2018 and 2019*).

Fino a pochi anni fa, si riteneva che il calcio dell'acqua fosse scarsamente assorbibile rispetto a quello contenuto in altre fonti alimentari, ma una serie di studi scientifici ha invertito questa convinzione, in particolare per le acque calciche (calcio > 150 mg/L) e bicarbonato-calciche (bicarbonato > 600 mg/L) (*Couzy et al., 1995; Cepolaro et al., 1996; Bacciottini, et al., 2004; Quattrini et al., 2016*).

Di seguito sono riportate le informazioni relative alla sperimentazione clinica.

2. Protocollo sperimentale:

2.1 Metodi

I soggetti arruolati per lo studio sono stati dapprima classificati in pre- o in post menopausa e, poi successivamente, suddivisi in modo randomizzato in singolo cieco in: *intervention group* (assumono 2 L/die acqua minerale effervescente naturale, bicarbonato-calcica e iposodica Lete) e *control group* (assumono 2 L/die acqua oligominerale addizionata con CO₂ di controllo).

Lo studio viene eseguito in conformità alle *Good Clinical Practice*, e alle normative vigenti in materia di sperimentazione clinica e a quelle di riferimento per le acque minerali naturali. (Verma, 2013; Ministero della Salute, 2018)

La versione attuale della Dichiarazione di Helsinki (2013), di riferimento per gli aspetti etici di questo studio clinico, è stata rispettata da tutti coloro che sono impegnati in questa ricerca.

Il protocollo, il consenso informato e qualsiasi altro materiale sono stati sottoposti alla revisione del Comitato Etico di riferimento.

Tutti i soggetti eleggibili sono stati informati sullo scopo dello studio, sui possibili rischi e benefici degli interventi proposti, e hanno ottenuto un documento informativo riportante la natura, lo scopo e il decorso dello studio.

I dati del soggetto in studio sono riservati e utilizzati in conformità alla legislazione vigente sulla protezione dei dati sensibili ed alla normativa sulla privacy.

2.2 Studio

Ai soggetti sono stati forniti dei consigli nutrizionali per un'alimentazione equilibrata e sana. Durante il reclutamento i partecipanti hanno compilato un FFQ *Food Frequency Questionnaire* per stabilire il loro quotidiano introito di calcio con la dieta. (Shatenstein et al., 2005)

I pazienti sono stati reclutati da diverse associazioni di donne.

Lo studio prevede misurazioni a 0 e 3 mesi. Centro operativo dello studio: Laboratorio di Ricerca Clinica Nutrizionale Universitario Nutriketo_Lab, Azienda Ospedaliera "San Giuseppe Moscati" di Avellino.

I due gruppi sottoposti al protocollo di studio sono stati sottoposti a:

Valutazione dello stato clinico: anamnesi fisiologica e patologica, esame obiettivo e valutazione nutrizionale, volti ad indagare le condizioni cliniche del paziente e la funzionalità degli apparati digerente e locomotore.

Esami strumentali: misure antropometriche, analisi metabolomica di siero.

Esami di laboratorio: prelievi ematico, urine 24h e urine del mattino con analisi di: HCO_3^- (mmol/L), calcio ionizzato Ca^{++} (mg/dL), 25-OHD (ng/mL), calcemia Ca (mg/dL), calciuria Ca U (mg/24h), creatinina CRE (mg/dL), creatinina urinaria CRE U (mg/24h), clearance creatinina CL. CR (mL/min), fosfatasi alcalina ALP (U/L), fosforemia P (mg/dL), fosfaturia P U (mg/24h), magnesiemia Mg (mg/dL), magnesuria Mg U (mg/24h), osteocalcina OSTEO (ng/mL), paratormone PTH (pg/mL), sodiemia Na (mmol/L), sodio urinario Na U (mmol/24h), pH urinario pH, peso specifico urine P.spec.

2.3 Sample size

Per calcolare il *sample size* e valutare la robustezza dello studio clinico è stata effettuata un'analisi statistica. Come fattori sono stati considerati il potere del test ($1-\beta$), che si desidera ottenere, ovvero la probabilità di rigettare l'ipotesi nulla quando esiste una reale differenza, la differenza minima tra i trattamenti (*intervention* e *control group*), la variabilità della misura e infine il livello di significatività α (5%), ovvero la probabilità di ottenere una differenza statisticamente significativa, quando di fatto differenza non c'è. Sono stati utilizzati a priori informazioni dalla letteratura scientifica. Il risultato ha stimato che sono necessari 28 soggetti per ogni gruppo da arruolare (*intervention* e *control group*), al fine di assicurare una potenza statistica di 0.95 con un $\alpha=0.05$, tramite un t-test a due code.

3. Risultati

3.1 Il campione

In **Tabella 1** sono riportate le caratteristiche demografiche dei soggetti arruolati per lo studio. Sono state incluse nello studio 58 donne in premenopausa (**1A**) (età >40 anni), e 56 in post-menopausa (**1B**) (periodo inizio menopausa 1-10 anni). E' stata considerata una popolazione omogenea, esposta ad analoghi fattori ambientali e soggetta a simili stili di vita. Sono stati considerati come criteri di

esclusione l'inclusione in altri protocolli di studio, l'uso di terapie farmacologiche (terapia ormonale estrogeno-sostitutiva, terapia per l'osteoporosi, terapia con corticosteroidi, terapia insulinica), l'assunzione di integratori a base di calcio, la presenza di patologie renali ed epatiche di livello medio-grave, condizione di osteoporosi severa già documentata (T-score MOC $<-2,5$).

Tabella 1A. Informazioni demografiche delle donne in pre menopausa partecipanti alla studio.

Caratteristiche demografiche e cliniche	Intervention group	Control group
Età (anni) (media $\pm$ SD)	47.04 $\pm$ 4.63	47.00 $\pm$ 3.81
Altezza (cm) (media $\pm$ SD)	163.67 $\pm$ 6.20	161.19 $\pm$ 6.3
Peso (Kg) (media $\pm$ SD)	72.56 $\pm$ 11.52	66.99 $\pm$ 9.18
Body Mass Index (kg/m ²) (media $\pm$ SD)	27.30 $\pm$ 4.20	26.04 $\pm$ 3.43
Livello di educazione (%)		
primario	26.28%	28.57%
secondario	43.47%	42.85%
università	30.25%	28.58%
Fumatori (%)	21.73%	33.33%
Attività fisica (%)	34.78%	38.09%

SD Deviazione standard
Nessuna differenza statistica significativa è stata rilevata tra i due gruppi

Tabella 1B. Informazioni demografiche delle donne in post menopausa partecipanti allo studio.

Caratteristiche demografiche e cliniche	Intervention group	Control group
Età (anni) (media $\pm$ SD)	54.31 $\pm$ 4.34	55.62 $\pm$ 3.30
Altezza (cm) (media $\pm$ SD)	151.28 $\pm$ 34.76	158.86 $\pm$ 4.78
Peso (Kg) (media $\pm$ SD)	69.01 $\pm$ 11.34	71.33 $\pm$ 15.87
Body Mass Index (kg/m ²) (media $\pm$ SD)	27.41 $\pm$ 4.64	30.50 $\pm$ 11.65
Livello di educazione (%)		
primario	46.15%	47.13%
secondario	42.30%	46.15%
università	11.55%	6.72%
Fumatori (%)	23.07%	19.23%
Attività fisica (%)	49.46%	35.59%

SD Deviazione standard
Nessuna differenza statistica significativa è stata rilevata tra i due gruppi

Per lo studio sono state utilizzate i) acqua minerale effervescente naturale Lete, bicarbonato-calcica e povera di sodio (*intervention group*) ii) acqua non bicarbonato-calcica oligominerale addizionata con CO₂ (*control group*) imbottigliata con un packaging uguale a quello dell'acqua minerale effervescente naturale Lete (**Tabella 2**).

Tabella 2. Composizione chimica delle acque minerali naturali testate.

Contenuto (mg/L)	Intervention group	Control group
calcio	305	86.2
magnesio	13.1	12.0
sodio	5.1	3.4
potassio	1.9	1.0
bicarbonati	930	310
cloruri	10.2	5.2
nitrati	5.1	3.1
fluoruri	0.3	0.1
silice	9.2	4.0

3.2 Dati chimico-clinici: analisi statistica univariata

In **Tabella 3** sono riportati i parametri chimico-clinici sottoposti ad analisi statistica utilizzando software *Statgraphics* (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia). Per ogni parametro è riportato il valore medio e la deviazione standard riferita ai singoli set di campioni ai tempi t0 e t3. L'analisi è stata condotta considerando per *intervention* e *control groups* sottogruppi di campioni corrispondenti a donne in pre (3A) e post menopausa (3B). L'analisi è stata validata usando test *T* di Student e curve ROC (D'Arrigo et al., 2011). Valori di p-value <0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Tabella 3A. Parametri chimico-clinici nelle donne in pre-menopausa al tempo t0 e al tempo t3 (3 mesi dopo il trattamento).

	preT0 Intervention group n=29	preT3 Intervention group n=29	preT0 Control group n=29	preT3 Control group n=29
HCO ₃ ⁻	29.03±2.69	30.80±3.05*	28.88±2.61	29.26±5.41
Ca ⁺⁺	4.26±1.33	4.68±0.12	4.70±0.19	4.70±0.77
25-OHD	28.05±10.63	44.73±14.87**	27.90±11.86	30.10±12.40*
Ca	9.27±0.39	9.55±0.32**	9.32±0.36	9.60±1.60**
Ca U	173.27±150.74	214.00±137.86	174.75±129.75	216.75±81.47
CRE	0.74±0.11	0.74±0.10	0.70±0.10	0.68±0.16
CRE U	1199.77±561.22	1203.95±559.92	1077.45±450.06	1046.85±333.90
CL.CR	112.95±52.16	114.23±46.96	110.65±45.24	112.70±33.72
ALP	64.00±24.62	60.68±18.78	54.75±12.67	56.05±16.45
P	3.36±0.41	3.57±0.35**	3.44±0.37	3.62±0.74
P U	694.05±433.70	681.23±383.28	603.05±320.46	647.55±275.33
Mg	2.00±0.12	2.00±0.15	2.01±0.14	2.00±0.35
Mg U	84.68±73.32	84.77±41.66	78.65±32.36	86.60±28.80
OSTEO	16.45±4.30	15.73±3.89	15.72±4.28	14.89±5.73
PTH	72.18±18.92	54.82±20.07***	54.90±17.46	53.95±26.00
Na	139.41±1.71	139.64±2.48	138.55±1.50	139.10±23.17
Na U	128.59±78.04	158.82±66.43	124.35±85.72	131.70±57.09
pH U	5.64±0.55	5.70±0.63	5.85±0.56	5.68±1.11
P.SPEC.	1016.77±6.67	1014.12±4.95	1016.55±5.75	1015.30±4.73

I dati sono espressi come media± deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test T di Student.

*p<.05. **p<.01. ***p<.001.

Tabella 3B. Parametri chimico-clinici nelle donne in post-menopausa al tempo t0 e al tempo t3 (3 mesi dopo il trattamento).

	postT0 Intervention group n=28	postT3 Intervention group n=28	postT0 Control group n=28	postT3 Control group n=28
HCO ₃ ⁻	30.61±2.00	32.03±2.44**	31.51±2.28	32.07±2.73
Ca ⁺⁺	4.77±0.24	4.69±0.14	4.53±0.90	4.66±0.19
25-OHD	29.74±13.92	35.63±12.78	29.12±11.82	35.92±12.06
Ca	9.51±0.33	9.70±0.38*	9.48±0.37	9.72±0.42**
Ca U	186.52±157.46	211.15±114.74	125.31±45.66	142.81±72.52
CRE	0.73±0.18	0.74±0.10	0.78±0.15	0.75±0.13
CRE U	1060.07±621.85	1217.07±546.23	920.08±249.39	968.42±314.74
CL.CR	105.59±68.76	117.30±49.56	86.31±26.52	94.08±32.07
ALP	69.11±13.58	71.41±15.75	64.65±16.89	62.04±15.49
P	3.64±0.41	3.70±0.42	3.68±0.22	3.77±0.48
P U	687.44±489.53	807.59±407.39	523.15±180.23	541.12±163.41*
Mg	1.99±0.12	2.03±0.12	2.00±0.16	2.00±0.16
MG U	83.96±55.12	99.26±43.76	66.46±30.25	62.15±28.17
OSTEO	19.16±4.00	18.45±5.11	18.92±6.94	18.92±6.94
PTH	65.41±15.74	48.30±17.32*	72.19±36.27	72.19±36.27*
Na	141.52±1.34	140.70±1.75*	141.00±1.41	140.81±1.20
Na U	120.63±63.05	151.59±58.03	107.65±32.11	139.27±60.58*
pH U	5.85±0.79	5.83±0.69	5.81±0.69	5.88±0.79
P.SPEC.	1017.85±7.23	1015.88±5.72	1016.42±5.71	1015.42±5.80

I dati sono espressi come media± deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test T di Student.

*p<.05. **p<.01. ***p<.001.

HCO₃⁻ (mmol/L), calcio ionizzato Ca⁺⁺ (mg/dL), 25-OHD (ng/mL), calcemia Ca (mg/dL), calciuria Ca U (mg/24h), creatinina CRE (mg/dL), creatinina urinaria CRE U (mg/24h), clearance creatinina CL. CR (mL/min), fosfatasi alcalina ALP (U/L), fosforemia P (mg/dL), fosfaturia P U (mg/24h), magnesemia Mg (mg/dL), magnesuria Mg U (mg/24h), osteocalcina OSTEO (ng/mL), paratormone PTH (pg/mL), sodiemia Na (mmol/L), sodio urinario Na U (mmol/24h), pH urinario pH U, peso specifico urine P.SPEC.

Analisi t0/t3 *intervention group* vs. *control group*. Analizzando i dati nel set completo di campioni definito *intervention group* diviso in sottogruppi di pre- e post-menopausa al tempo t0 e dopo 3 mesi (t3) si osserva un aumento statisticamente significativo di HCO₃⁻ (+5.20%), Ca sierico (+2.36%), 25-OHD (+20.00). Si osserva inoltre una riduzione significativa di PTH. Per vitamina 25-OHD e PTH sono state calcolate le curve ROC (**Figura 1**), le quali confermano la significatività dei dati.

Nel *control group* per tutti i parametri si osservano fluttuazioni fisiologiche tra t0 e t3. Indicando nessun effetto significativo sul quadro chimico clinico del trattamento con un'acqua diversa dall'acqua minerale effervescente naturale Lete.

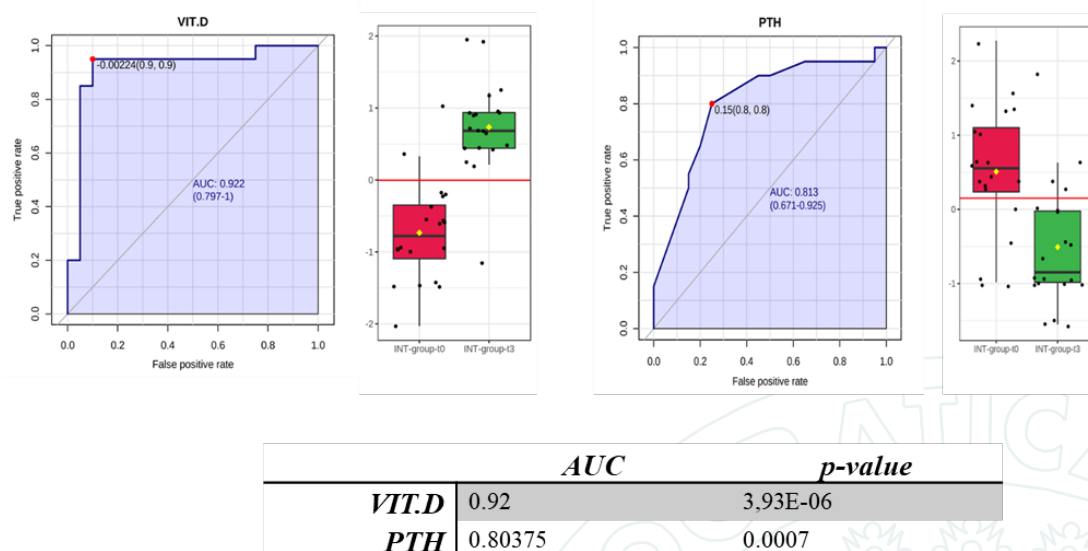


Figura 1: Curve ROC relativi ai parametri clinici con AUC>80 e *p-value*< 0.05.

Analisi t0/t3 intervention group vs. control group su campioni divisi in pre- e post- menopausa.

Analizzando i dati nel set completo di campioni definito *intervention group* diviso in sottogruppi di pre- e post-menopausa al tempo t0 e t3, si osserva un aumento significativo in entrambi i gruppi di HCO_3^- (pre +6.10% e post +4.62%) Ca sierico (pre +3.01%, post +1.91%), 25-OHD (pre +23.82%, post 16.53%), P (pre +6.27%). Si osserva poi una significativa riduzione di PTH (pre -24.06% e post -25.87%).

Nel control group per tutti i parametri si osservano fluttuazioni fisiologiche sia nel sottogruppo premenopausa che post-menopausa. Indicando nessun effetto significativo sul quadro chimico clinico del trattamento con un'acqua diversa da acqua minerale effervescente naturale Lete.

3.3 Dati chimico-clinici: analisi statistica multivariata

Il set di dati clinici relativi a *intervention* e *control group* a t0 e t3 sono stati analizzati anche con metodiche di analisi multivariata supervised (Krzanowski, 2000); Chatfield and Collins, 2018). La capacità predittiva dei modelli è stata validata mediante *cross validation test* (Xia et al., 2009) e *permutation test* (Xia et al., 2009). I dati sono stati analizzati con *Orthogonale Partial least squares discrimination analysis* (O-PLS-DA) (Bylesjö et al., 2006, Chong et al., 2019) utilizzando la piattaforma MetaboAnalyst 5.0 (MVA) (Pang et al., 2021). Le prestazioni del modello O-PLS-DA sono state valutate utilizzando un metodo di convalida incrociata (indice Q2, R2). È stato utilizzato una rappresentazione grafica di loading plot per identificare i metaboliti significativi responsabili

della massima separazione nel grafico dei punteggi O-PLS-DA e questi metaboliti sono stati classificati in base alla loro influenza variabile sui punteggi di proiezione (VIP).

In **Figura 2** si riporta la rappresentazione grafica della O-PLS-DA condotta sul set di dati chimico-clinici relativi all'intero *intervention group* a t0 (cluster rosso) e t3 (cluster verde). Il grafico evidenzia clusters ben separati, con *cross-validation* significativa ($Q^2 > 50\%$), dunque indicando un profilo di dati chimico-clinici significativamente differenti per i due insiemi di campioni.

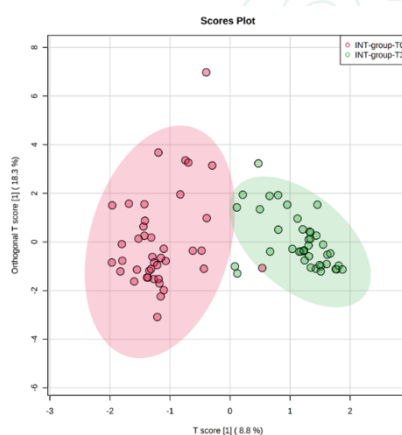


Figura 2. O-PLS-DA score plot relativo al set di dati chimico-clinici nell'*intervention group* a t0 (rosso) e a t3 (verde).

La stessa procedura di O-PLS-DA è stata applicata al set di dati clinici relativi all'*intervention group* divisi in campioni pre e post menopausa. In **Figura 3** i grafici di O-PLS-DA mostrano per i campioni in pre-menopausa una parziale separazione dei clusters a T0 e T3, mentre per i campioni in post-menopausa una separazione dei clusters completa. Questo tipo di configurazione indica che per il set di campioni in pre menopausa il profilo di dati chimico-clinici a T3 è moderatamente diverso da quello a T0. Per il set di campioni post menopausa il profilo di dati chimico-clinici a T3 è significativamente diverso rispetto a T0.

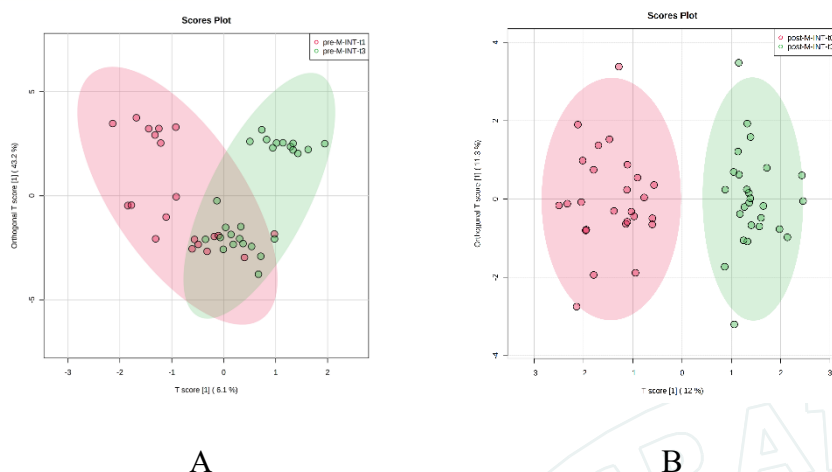


Figura 3. O-PLS-DA score plot nell'*intervention group* a t0 (rosso) e a t3 (verde) in pre- (A) e post (B) menopausa.

La O-PLS-DA condotta sul control group a t0 e t3 in pre- e post- menopausa (**Figura 4**) non mostra una separazione significativa dei profili chimico-clinici nei due tempi, indicando nessun effetto significativo sul quadro chimico clinico del trattamento con un'acqua diversa da acqua minerale effervescente naturale Lete.

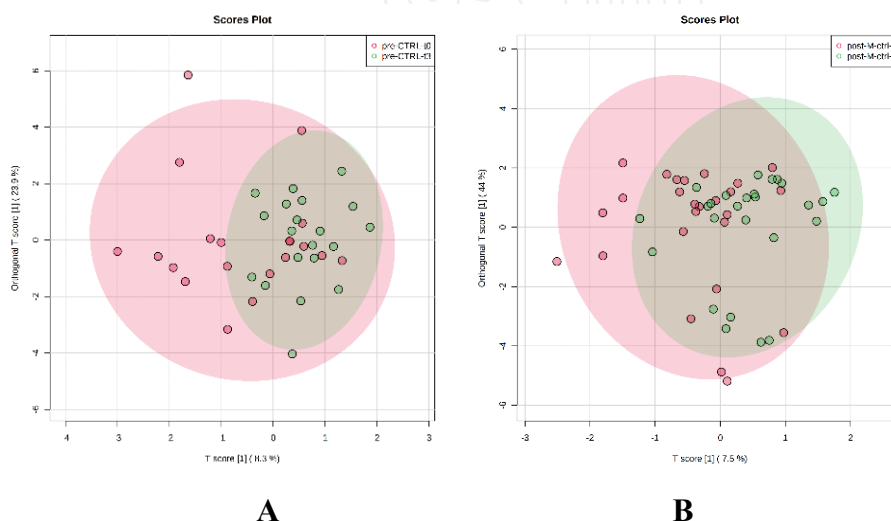


Figura 4. O-PLS-DA score plot nel *control group* a t0 (rosso) e a t3 (verde) in pre- (A) e post (B) menopausa.

VIP score analysis. Per comprendere quali metaboliti siano responsabili della separazione dei cluster T0/T3, ossia della differenziazione dei profili chimico clinici, è stata effettuata l'analisi *Variable Importance in Projection* (VIP) sui risultati della O-PLS-DA nell'*intervention group* a t0 (rosso) e a t3 (verde) in pre- (A) e post (B) menopausa. Sono considerati significativi solo valori di VIP score > 1. La VIP score analysis mostrata in **Figura 5** conferma i più significativi risultati derivanti dall'analisi univariata per cui i metaboliti significativamente responsabili della clusterizzazione dei profili dei dati chimico clinici sono la vitamina D e il PTH.

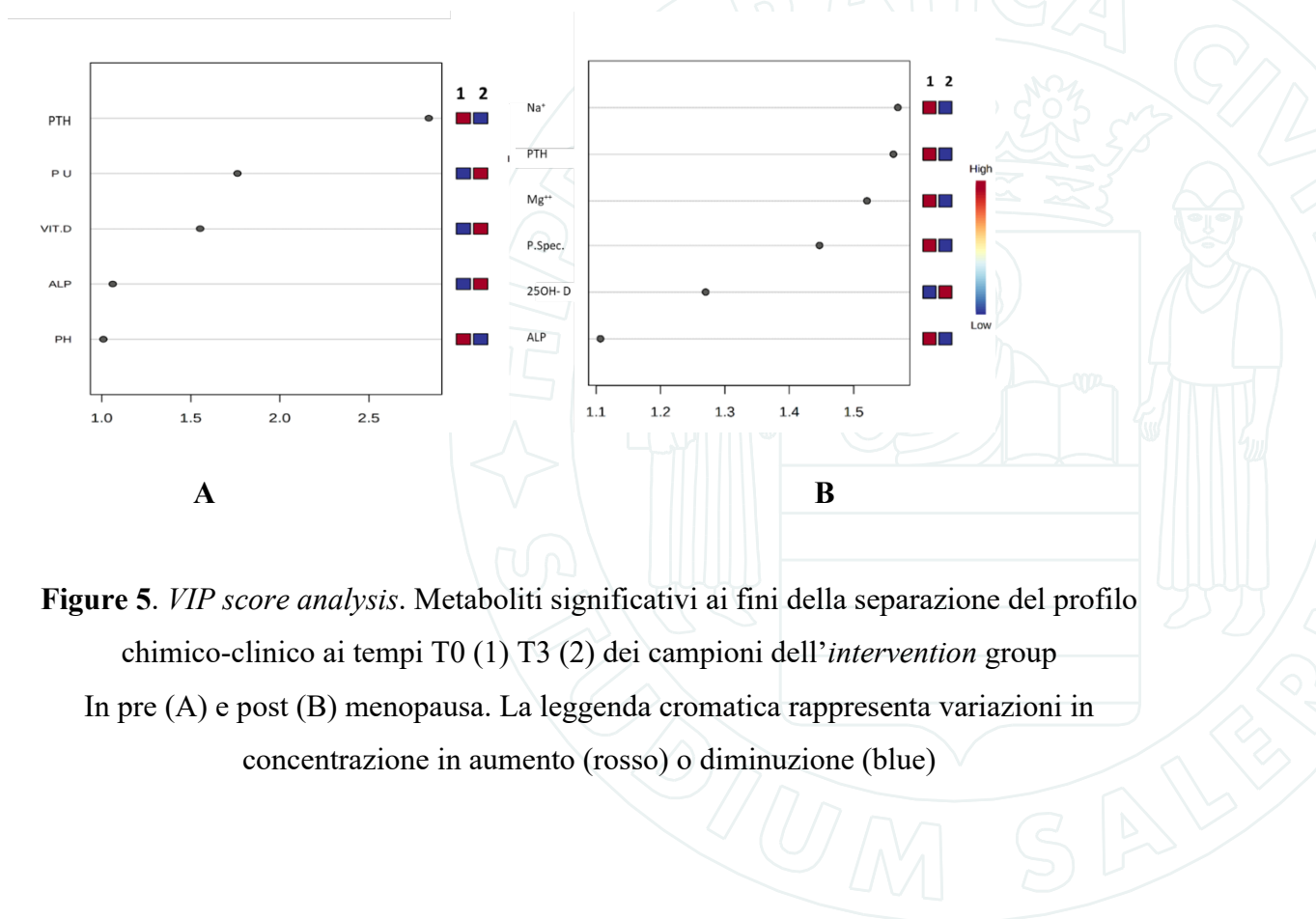


Figure 5. *VIP score analysis.* Metaboliti significativi ai fini della separazione del profilo chimico-clinico ai tempi T0 (1) T3 (2) dei campioni dell'*intervention group* In pre (A) e post (B) menopausa. La leggenda cromatica rappresenta variazioni in concentrazione in aumento (rosso) o diminuzione (blue)

3.4 Dati siero metabolomica spettroscopia NMR

A supporto dei dati ricavati dalla precedente analisi, è stata effettuata l'analisi metabolomica mediante spettrometria di risonanza magnetica nucleare (NMR) su un sottocluster di pazienti (N=20). Data l'esiguità del numero, i dati si considerano ancora preliminari. Tuttavia ci preme mostrarli perché validano i risultati ottenuti mediante le classiche analisi di laboratorio.

3.4.1 Generalità

La metabolomica è una branca delle scienze “omiche” che si occupa dell’identificazione e della quantificazione di metaboliti (piccole molecole < 2000 Da) presenti nel metaboloma (*Psychogios et al.*, 2011). Il metaboloma è l’insieme di tutti i metaboliti di un organismo biologico, prodotti finali del metabolismo, che includono ormoni ed altre molecole segnale, intermedi metabolici e metaboliti secondari.

La spettroscopia NMR e la spettrometria di massa sono le tecniche principalmente utilizzate per definire il profilo metabolomico dei vari biofluidi.

La metabolomica mediante NMR consente la raccolta contemporanea di tutte le concentrazioni di metaboliti, senza trattamento dei campioni e calibrazione strumentale (*Craig et al.*, 2006). Inoltre, la spettroscopia NMR è l’unica tecnica d’indagine che non si basa sulla separazione degli analiti quindi il campione può essere recuperato per ulteriori analisi: al momento è l’unico metodo disponibile per lo studio di campioni intatti.

3.4.2 Raccolta e preparazione dei campioni

Per ottenere la porzione sierica dal sangue, il sangue intero è stato raccolto in provette non contenenti anticoagulante e lasciato coagulare a temperatura ambiente per 30 min. Dopo la centrifugazione a 12.000 g, il siero è stato aliquotato e conservato a -80 ° C in fiale criogeniche Greiner prima delle misurazioni mediante spettroscopia NMR. I campioni NMR sono stati preparati mescolando 300 µL di siero con 200 µL di tampone fosfato, inclusi 0.075 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4% NaN_3 e H_2O . L’acido trimetilsilil propionico-2,2,3,3- d_4 , sale sodico (0.1% TSP in D_2O) è stato utilizzato come riferimento interno per l’allineamento e la quantificazione dei segnali NMR; la miscela, omogeneizzata mediante vortex per 30 s, è stata trasferita in una provetta NMR da 5 mm (provette Bruker NMR) prima dell’inizio dell’analisi (*Beckonert et al.*, 2007).

3.4.3 Acquisizione degli spettri e identificazione dei metaboliti

Gli esperimenti NMR sono stati eseguiti su spettrometro Bruker DRX600 MHz (Bruker, Karlsruhe, Germania) dotato di un 5 millimetri tripla risonanza z -gradient CryoProbe. TOPSPIN 3.0, è stato utilizzato per il controllo spettrometrico e l’elaborazione dei dati (Bruker Biospin, Fällanden, Svizzera). Sono stati acquisiti esperimenti Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) idonei ai biofluidi non filtrati (*Pell et al.*, 2006). Gli spettri NMR sono stati fasati manualmente e corretti alla linea di

base. La quantificazione dei metaboliti sierici è stata ottenuta utilizzando il software di quantificazione automatica Bayesil (Ravanbakhsh *et al.*, 2015). Bayesil è un software in grado di eseguire tutte le fasi di elaborazione spettrale, inclusa la trasformazione di *Fourier*, la fasatura, il filtraggio del solvente, il riferimento allo spostamento chimico, la correzione della linea di base e la convoluzione della forma della linea di riferimento automaticamente. Quindi deconvoluziona lo spettro NMR risultante utilizzando una libreria spettrale di riferimento, che qui contiene le firme di oltre 60 metaboliti. Questo processo di deconvoluzione determina sia l'identità che la quantità dei composti nella miscela di biofluidi. Test approfonditi mostrano che Bayesil soddisfa o supera le prestazioni di esperti umani altamente qualificati (Davis *et al.*, 1994).

3.4.4 Analisi dei dati mediante approcci statistici

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate mediante metodiche univariate (T-test e ROC curve) e multivariate (PLS-DA) utilizzando il software MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) (Pang 2021). La significatività dell'analisi multivariata è stata valutata mediante indice p.value (<0.05) e FDR (<1). Le prestazioni del modello PLS-DA sono state valutate utilizzando un metodo di convalida incrociata (indice Q^2 , R^2). È stato utilizzato una rappresentazione grafica di loading plot per identificare i metaboliti significativi responsabili della massima separazione nel grafico dei punteggi PLS-DA e questi metaboliti sono stati classificati in base alla loro influenza variabile sui punteggi di proiezione (VIP).

3.4.5 Risultati

Gli estratti sierici sono stati analizzati mediante metodica univariata classica. Il *T-test* è stato condotto sulle concentrazioni di tutti i metaboliti appartenente ai clusters *intervention group t0* vs. *intervention group t3*. È stato calcolato il *p.value* imponendo come *threshold* significativa valori <0.05 e il *False Discovery Rate* (FDR) imponendo come *threshold* valori <1 (**Tabella 4**).

In **Figura 6** sono rappresentate le curve ROC relative ai metaboliti con $AUC > 90$ e $p\text{-value} < 0.05$; per ogni ROC curve sulla destra è stato rappresentato il *Whisker plot* (Banacos, 2011) graficando le concentrazioni come $\text{media} \pm \text{SD}$, indicando con il quadrato giallo il valore medio.

Dall'analisi mediante curve ROC emerge la riduzione significativa delle concentrazioni di L-Serina e Succinato a $t3$ e l'aumento significativo delle concentrazioni di Isobutirrato, Idrossibutirrato, Acido lattico, Glicina, Glutamina e Aspartato nell'*intervention group* a $t3$.

Tabella 4. Analisi univariata condotta sulle concentrazioni di metaboliti relativi al confronto dei clusters *intervention group t0* vs. *intervention group t3* mediante T-test.

	t.stat	p.value	FDR
L-Serine	16.219	1,15E-14	4,92E-13
Isobutyric acid	-15.144	1,10E-13	2,37E-12
Glycine	-12.059	1,47E-10	2,11E-09
Methanol	-11.157	1,49E-09	1,60E-08
L-Glutamine	-97.448	6,97E-08	5,99E-07
2-Hydroxybutyric acid	-92.561	2,80E-08	2,00E-06
L-Lactic acid	-91.755	3,53E-07	2,17E-06
Aspartate	-90.081	5,73E-07	3,08E-06
Succinate	88.234	9,82E-07	4,69E-06
L-Asparagine	81.891	6,44E-06	2,77E-05
Isopropyl alcohol	-78.587	1,75E-05	6,84E-05
Acetone	-7.737	2,53E-05	9,07E-05
Hypoxanthine	72.235	1,23E-04	4,06E-04
L-Glutamic acid	-71.896	1,36E-04	4,19E-04
Isoleucine	-64.443	1,40E-04	3,84E-03
Valine	-64.385	1,43E-03	3,84E-03
Betaine	-62.841	2,32E-03	5,87E-03
L-Threonine	-62.541	2,55E-03	6,10E-03
Creatine	-57.396	1,30E-02	2,93E-02
Citric acid	-57.216	1,37E-02	2,95E-02
Acetic acid	5.682	1,55E-02	3,18E-02
Creatinine	55.312	2,50E-02	4,89E-02
L-Leucine	54.893	2,86E-02	5,34E-02
L-Phenylalanine	51.033	9,61E-02	1,72E-01
1-Methylhistidine	49.125	1,74E-01	3,00E-01
D-Glucose	-45.763	4,94E-01	8,17E-01
Tryptophan	39.936	0.00028783	0.0004584
3-Hydroxybutyric acid	-39.383	0.00033902	0.00050673
L-Ornithine	-39.355	0.00034175	0.00050673
Glycerol	38.827	0.00039929	0.00057232
L-Lysine	-3.797	0.00051317	0.00071182
Choline	-30.824	0.0038113	0.0051215
L-Proline	28.655	0.006749	0.0087941
L-Histidine	-27.049	0.010168	0.01286

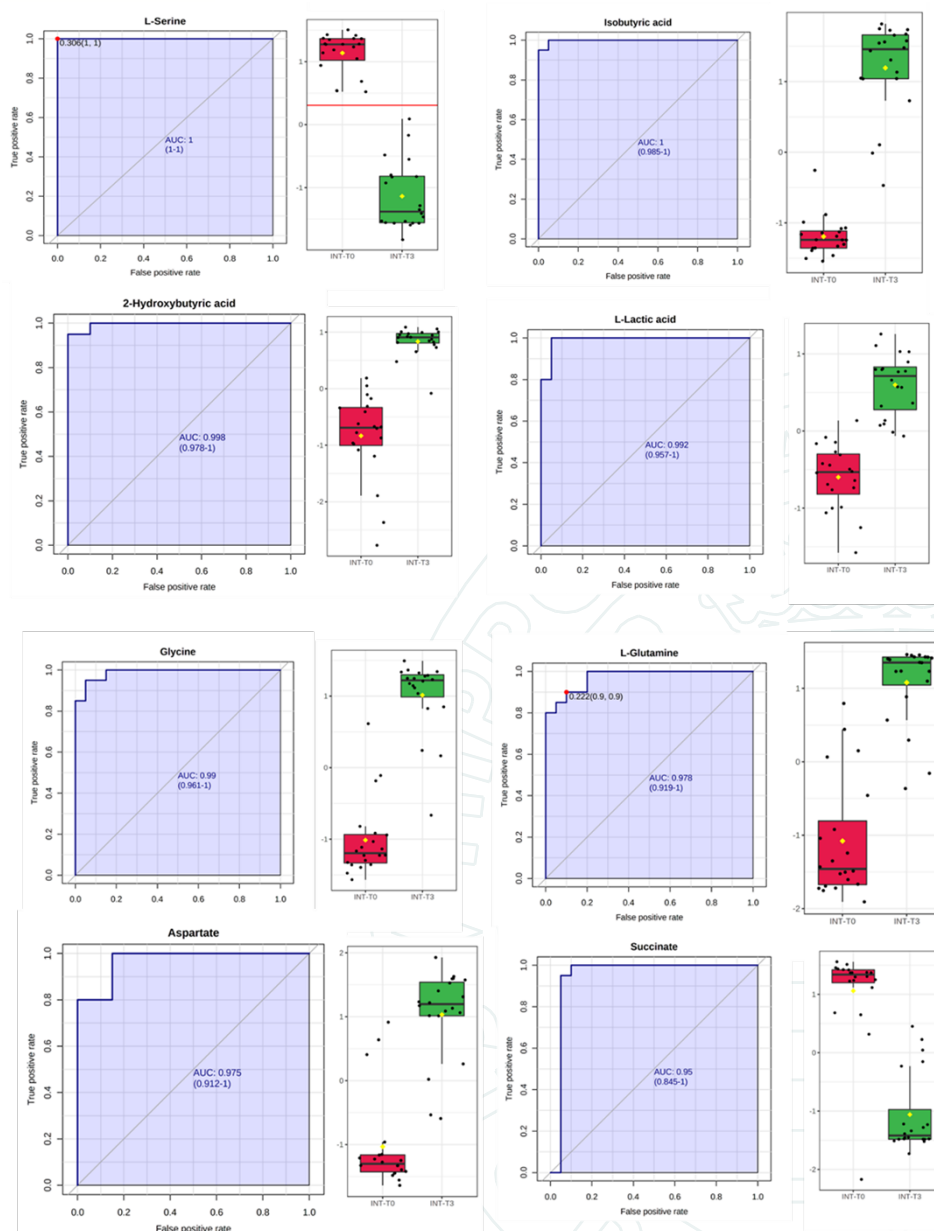


Figure 6. Curve ROC calcolate sulla matrice relative alle concentrazioni dei metaboliti sierici dell'*intervention group* a t0 e a t3.

L'analisi multivariata mediante PLS-DA (**Figura 7**) mostra una buona separazione spaziale dei clusters *intervention group* a t0 (cluster rosso) e *intervention group* a t3 (cluster verde); ciò indica un diverso profilo metabolomico caratterizzante i pazienti prima e dopo l'assunzione di acqua Lete. Il *loading plot* sulla destra rappresenta i metaboliti significativi responsabili della massima separazione. L'analisi PLS-DA è stata validata mediante *cross-validation* e riporta indici di accuratezza pari a 98% e indice di predizione pari a 91%.

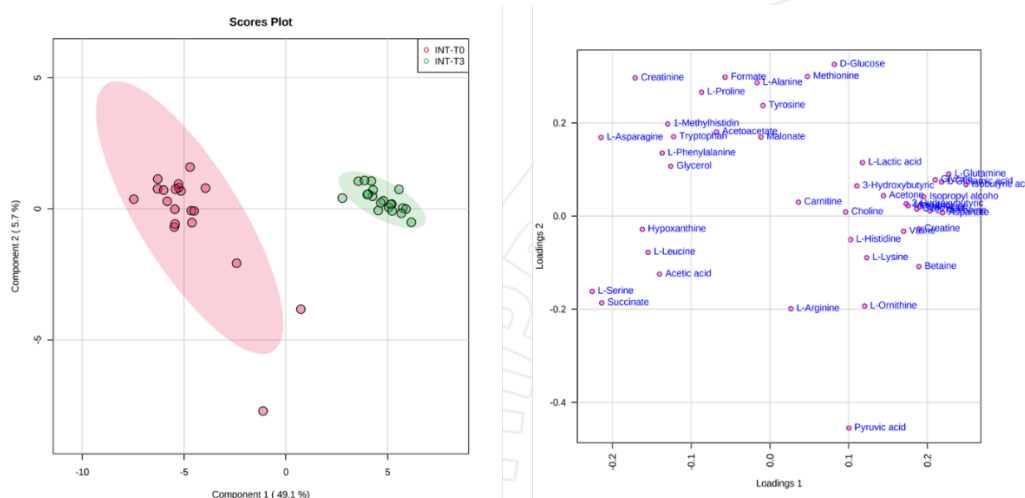


Figura 7. PLS-DA *score plot* e *loading plot* relativo alle concentrazioni di metaboliti sierici calcolati nell'*intervention group* a t0 e a t3.

I risultati dell'analisi VIP score (*Xia and Wishart, 2011*) mostrata in **Figura 8** evidenzia i metaboliti discriminanti relativi all' *intervention group* prima e dopo l'assunzione di acqua effervescente naturale Lete. In particolare l'analisi del VIP score sui dati derivati dallo studio metabolomico NMR evidenzia aumento delle concentrazioni di isobutirrato, glutammina, glutammato, glicina e aspartato nell'*intervention group* a t3. Dimostra inoltre riduzione delle concentrazioni di L-serina.

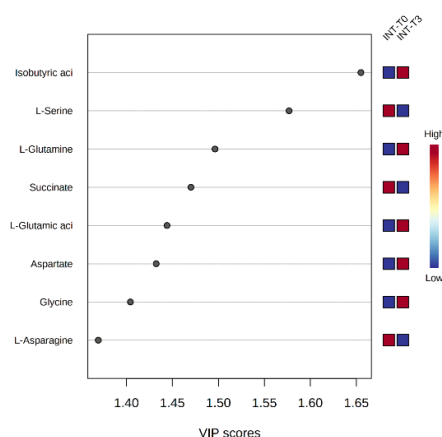


Figure 8. *VIP score analysis.* Metaboliti derivati da analisi metabolomica NMR significativi ai fini della separazione del profilo chimico-clinico ai tempi T0 e T3. La leggenda cromatica rappresenta variazioni in concentrazione in aumento (rosso) o diminuzione (blue)

L'analisi metabolomica NMR mostra un coinvolgimento di metaboliti che hanno relazione con il metabolismo osseo in particolare:

- i) Studi recenti hanno infatti dimostrato che l'integrazione terapeutica di Short Chain Fatty Acids (SCFA) quali l'acido butirrico o la produzione endogena di SCFA possono fornire un potente strumento per bilanciare l'attività degli osteoclasti e inibire il riassorbimento osseo (*Lucas et al.*, 2018)
- ii) Il metabolismo della glutammina e del glutammato, svolge anche un ruolo in diversi processi cellulari nelle cellule ossee, in particolare, promuovendo l'apposizione di nuova matrice ossea e ostacolando l'azione degradativa degli osteoclasti (*Cowan et al.*, 2012; *Suzuki and Iwata*, 2021)
- iii) La glicina e l'aspartato hanno un ruolo centrale nel metabolismo del collagene. È stato dimostrato che l'aumento della glicina potrebbe essere una strategia per aiutare la rigenerazione della cartilagine migliorando la sintesi del collagene, che potrebbe contribuire al trattamento e alla prevenzione dell'osteoartrite (*de Paz-Lugo et al.*, 2018) (*Raman et al.*, 2006)

- iv) La serina è in grado di attivare il fattore nucleare per la osteoclastogenesi aumentando il riassorbimento cellulare; pertanto una regolazione dei livelli di L-Serina indurrebbe una regolazione dell'espressione dei cluster genici connessi al riassorbimento osseo (*Ogawa, et al.*, 2006; *Takarada et al.*, 2012). Analogamente alla serina, anche il succinato è in grado di stimolare l'osteoclastogenesi contribuendo all'aumento della fragilità ossea (*Guo et al.*, 2017).

4. Discussione

Nella società occidentale, l'invecchiamento è accompagnato da una perdita di massa ossea. L'osteoporosi è una condizione in cui il riassorbimento osseo supera la formazione ossea, che conduce a una progressiva perdita di massa ossea e alla distruzione dell'architettura ossea. L'idea che l'osteoporosi potrebbe in parte essere dovuta all'assunzione alimentare di precursori acidi in eccesso rispetto a quelli basici e che la conseguente riduzione della massa ossea indotta dall'acidosi metabolica potrebbe essere rallentata o impedita dal consumo di una dieta di tipo basica è stato proposto per la prima volta circa 50 anni fa da *Wachman e Bernstein* (*Wachman & Bernstein*, 1968). Le moderne diete occidentali, con un contenuto di carne di origine animale più elevato rispetto a frutta e verdura, comportano un maggiore contenuto di precursori acidi rispetto a quelli basici, il che si traduce in un carico acido nel corpo. Per prevenire l'inesorabile accumulo di acido nel corpo e gradi progressivamente crescenti di acidosi metabolica, il corpo deve essere in grado di tamponare e/o espellere tutti gli acidi in eccesso ingeriti o prodotti. Più sistemi nel corpo intervengono e in particolare i globuli rossi, le cellule muscolari e le ossa. L'osso è un grande serbatoio di base (25.000-30.000 milliequivalenti (mEq) (1 milliequivalente uguale 1 mmol di un composto ionico con carica +1 o -1, (es. sodio (Na), potassio (K), cloruro (Cl), bicarbonato (HCO_3^-)) sotto forma di sali alcalini di calcio (es. idrossiapatite di calcio, calcio carbonato). L'osso rappresenta quindi una fonte basica che il nostro organismo sfrutta per bilanciare l'ambiente in caso di eccesso di carico acido (*Peacock*, 2010).

L'acqua minerale effervescente naturale Lete ricca di bicarbonati (fonte basica) interviene positivamente in questo scenario. L'ambiente alcalino creato dall'acqua riduce il riassorbimento osseo e favorisce inoltre, come si osserverà in seguito, l'assorbimento del calcio, già riportato da *Wynn et al.*, 2009. La variazione significativa che si osserva per i livelli di HCO_3^- è in accordo ai risultati evidenziati anche da *Dumartheray et al.* (2007) e da *Burckhardt* (2008).

L'analisi dei dati evidenzia variazioni dei parametri clinici in linea con una significativa modifica del metabolismo del Ca. Tale modifica risulta direttamente evidente in una variazione delle concentrazioni di Ca, HCO_3^- , nonché in modifiche di parametri quali il PTH e 25-OHD che indirettamente sono legati ai livelli di Ca. In particolare, questi ultimi hanno un'azione regolatoria, per cui la incrementata assunzione di Ca si traduce in un miglioramento dell'effetto funzionale del Ca nelle sedi, quali il tessuto osseo, in cui la presenza di adeguate concentrazioni di Ca è indispensabile (Meunier *et al.*, 2005).

I dati clinici mostrano che dopo il trattamento i parametri di laboratorio variano come di seguito nell'*intervention group*:

- **Aumento dei livelli di 25-OHD** L'Associazione Italiana degli Endocrinologi Clinici raccomanda livelli uguali o superiori a 30 ng/mL in condizioni di menopausa, età avanzata, osteoporosi. Dopo l'assunzione di acqua minerale effervescente naturale Lete i livelli di questa vitamina raggiungono una concentrazione soddisfacente (pre 44.73 ± 14.87 ng/mL, post 35.63 ± 12.78 ng/mL). La funzione principale e più nota della vitamina D è quella di favorire il processo di mineralizzazione dell'osso, aumentando l'assorbimento intestinale di fosforo e calcio. Inoltre è di particolare importanza il suo contributo al buon funzionamento del sistema di difesa dell'organismo.
- **Aumento dei livelli di calcio ematico** Si osserva una migliore disponibilità del calcio derivante dall'assunzione di acqua bicarbonato-calcica iposodica, a dimostrazione del fatto che il calcio assunto è altamente biodisponibile. Il calcio, per essere assorbito, si deve trovare nella giusta forma prima di essere captato dalla mucosa intestinale. Se si trova nella forma complessata, deve essere prima solubilizzato nello stomaco e poi successivamente potrà essere assorbito. Piccoli introiti di calcio sono assorbiti per trasporto attivo. A dosi maggiori tale meccanismo si satura e subentra il trasporto passivo (non saturabile), con diffusione tra le giunzioni intercellulari degli enterociti (cellule intestino). A concentrazioni elevate (15-500 mg/L) (Heaney *et al.*, 1990; Heaney and Dowell, 1994) tale meccanismo si satura e subentra il trasporto passivo a livello del piccolo intestino. Questo non è saturabile e varia proporzionalmente all'assunzione di calcio (Theobald, 2005). Quindi, alla luce dei

citati meccanismi di assorbimento e visto che la frazione assorbita per trasporto passivo aumenta all'aumentare del contenuto calcico del chimo, è possibile sostenere che a parità di acqua bevuta, concentrazioni più elevate di calcio comportano un assorbimento proporzionalmente maggiore dello stesso. Tesi ancor più rafforzata dal fatto che Il volume di acqua giornaliero raccomandato (2L) con un contenuto di calcio di circa 610 mg (acqua minerale effervescente naturale Lete) viene assunto in maniera graduale e scaglionata durante l'intero arco della giornata. Non si tratta, quindi, di un vero “carico” ma di un'assunzione che avviene in maniera continua ogni qualvolta si beve. Questa integrazione di calcio esterna entra a far parte del complesso metabolismo del calcio e contribuisce in maniera positiva alla salute delle ossa come stato osservato dai nostri risultati sperimentali.

- **Diminuzione dei livelli di PTH** Tale riduzione statisticamente significativa è correlata ad un incremento dell'assorbimento di calcio. La produzione e la secrezione del PTH dipendono dalla concentrazione del calcio nel plasma: una diminuzione della concentrazione di calcio comporta una secrezione di PTH, che interviene per ripristinare la concentrazione di calcio, mentre un aumento conduce a una inibizione della sua secrezione. I risultati dello studio sperimentale mostrano una diminuzione del PTH in ragione della maggiore concentrazione di calcio assunta e, quindi, disponibile per essere utilizzata nel nostro organismo. Il PTH riesce a regolare l'omeostasi del calcio in diversi modi. A partire nel rene in cui il PTH promuove il riassorbimento del calcio e di conseguenza comporta una diminuzione dell'escrezione urinaria di calcio. Infine, il PTH agisce sempre sul rene per la formazione del calcitriolo (forma attiva della vitamina D), che nell'intestino fa aumentare l'assorbimento del calcio. I dati sperimentali evidenziano un aumento della 25-OHD. Tali ormoni sono inversamente proporzionali.
- **Aumento dei livelli di calcio urinario** (calcio urinario delle 24 h) riflette il carico di calcio biodisponibile a seguito dell'assunzione di un'acqua bicarbonato-calcica iposodica come l'acqua minerale effervescente naturale Lete. L'aumentata escrezione di Ca è associata ad una significativa supplementazione del minerale dovuta al consumo di acqua minerale effervescente naturale Lete e inoltre all'aumentata escrezione di Na. Il meccanismo fisiologico alla base dell'ipercalciuria è legato all'incremento del volume plasmatico, dovuto ad un aumento del suo carico, che ne favorisce la filtrazione a livello renale.

- **Aumento dei livelli di Na urinario** L'escrezione di Na aumenta insieme al calcio urinario per regolare il volume plasmatico. Alti livelli di sodio aumentano la perdita di calcio nelle urine (*Böhmer et al.*, 2000) e ne limitano la deposizione nelle ossa, come dimostrato anche da altri studi (*Massey et al.*, 1996; *O'Brien et al.*, 1996). Le acque ricche di calcio e povere di sodio (<20mg/L), come l'acqua minerale effervescente naturale Lete, (305 mg/L Calcio e 5.1 mg/L di sodio) rappresentano un valido ed efficace strumento di integrazione. L'introito di sodio è positivamente correlato all'escrezione del calcio urinario. Un aumento di 100 mmol (2300 mg) di sodio con la dieta comporta un aumento di 1 mmol (40 mg) di calcio escreto con urine (*Nordin et al.*, 1997).

Dall'analisi di questi dati possiamo affermare che un'acqua ricca di calcio può essere considerata una fonte preziosa di calcio altamente assimilabile perché prontamente biodisponibile. Il calcio contenuto nell'acqua scelta per questa sperimentazione (305 mg/L) ha una concentrazione comparabile a quella di prodotti lattiero-caseari o preparazioni farmaceutiche (*Böhmer et al.*, 2000; *Bacciottini et al.*, 2004) (202-585 mg/L). Il calcio in questione viene assorbito nell'intestino, in quanto si trova nella forma libera, non complessata. Inoltre, nell'acqua non sono presenti fattori che potrebbero diminuire l'assorbimento del calcio, quali fitati, ossalati, fosfati, etc.

La presenza del sodio influenza negativamente la capacità di assorbimento del calcio e diversi studi scientifici hanno chiaramente riportato l'effetto limitante del sodio sulla capacità di captazione del calcio da parte delle cellule (*Teucher et al.*, 2008). Il basso contenuto di sodio dell'acqua studiata (5.1 mg/L) rappresenta quindi un aiuto considerevole per favorire l'assorbimento del calcio.

Conclusioni

I fattori nutrizionali hanno un'influenza significativa sulla causa dell'osteoporosi. La supplementazione di calcio può essere particolarmente efficace nelle popolazioni con una dieta a basso contenuto di calcio. Un'integrazione di 500 mg/die può produrre circa il 4% di aumento del calcio scheletrico negli adolescenti. Un'integrazione di 800 mg/die può prevenire la perdita ossea nelle donne in postmenopausa. Le acque minerali bicarbonato calciche rappresentano una fonte

importante e immediata di calcio altamente assimilabile: possono essere assunte dai soggetti che necessitano di una integrazione, senza introdurre calorie e grassi.

L'analisi di tutti i dati, le misurazioni e le analisi statistiche nel corso dello studio clinico, condotto su 58 donne in premenopausa (età >40 anni), e 56 in post-menopausa (periodo inizio menopausa 1-10 anni), permettono di affermare che un consumo giornaliero di circa 610 mg/L di calcio, mediante l'assunzione di 2L di acqua minerale effervescente naturale Lete, bicarbonato-calcica iposodica, è in grado di produrre un aumento statisticamente significativo di HCO_3^- (+5.20%), Ca sierico (+2.36%), 25-OHD (+20.00), di abbassare significativamente i livelli di PTH e di modificare gli indici biochimici del turnover osseo nelle donne sottoposte al nostro studio. I nostri dati confermano che il calcio veicolato attraverso il consumo di acqua minerale effervescente naturale Lete può considerarsi altamente assimilabile, determinando il soddisfacimento di un'elevata percentuale del fabbisogno giornaliero di calcio (42-65%), a seconda delle condizioni fisiologiche dell'organismo.

Nel nostro studio, il consumo di acqua effervescente naturale Lete da parte di donne sia in pre- che post-menopausa, con un basso introito di calcio alimentare, è stato in grado di abbassare i livelli di PTH (pre -24.06% e post -25.87%, p .001) e di influenzare i principali indici del turnover osseo (p.e. 25-OHD pre +23.82%, post 16.53%).

I nostri dati confermano che a parità di acqua bevuta, concentrazioni più elevate di calcio comportano un assorbimento proporzionalmente maggiore dello stesso, ancor più nel caso di un'acqua consumata in maniera graduale durante l'intero arco della giornata. Nel nostro studio, inoltre, è stata osservata una correlazione positiva tra introito di sodio ed escrezione del calcio urinario. E' noto dalla letteratura l'effetto limitante del sodio sulla capacità di captazione del calcio da parte delle cellule, e il suo effetto ipercalciorico è correlabile alla patogenesi dell'osteoporosi. Il basso contenuto di sodio dell'acqua minerale effervescente naturale Lete (5.1 mg/L) rappresenta quindi un aiuto considerevole per favorire l'assorbimento del calcio presente nell'acqua. Questa particolare condizione (iposodica) potenzia ulteriormente la capacità di assorbire il Calcio presente nell'acqua. Ciò maggiormente in un contesto occidentale di diete ad alto contenuto di sodio.

Ulteriori conferme sulla capacità di acqua minerale effervescente naturale Lete, bicarbonato-calcica iposodica, di influenzare i principali indici del turnover osseo sono arrivate dall'analisi metabolomica mediante spettroscopia NMR del siero delle pazienti, una tecnica analitica innovativa utilizzata in ambito biomedico che ha il vantaggio di essere rapida e di non richiedere particolare trattamento dei campioni. L'analisi del siero ha permesso di identificare l'intero spettro di metaboliti presenti nei campioni analizzati ottenendo un'impronta digitale metabolica in grado di

chiarire l'effetto del trattamento sulle partecipanti e il loro stato di salute. Misurazioni chiave hanno rilevato il coinvolgimento di metaboliti che hanno relazione con il metabolismo osseo (glutamina, glutammato e serina) e con la tutela e protezione del collagene e delle articolazioni (aspartato e glicina).

Nei tessuti ossei, sono noti due tipi cellulari distinti per regolare in modo coordinato la formazione e il mantenimento dell'osso: gli osteoblasti che formano l'osso e gli osteoclasti che riassorbono l'osso. Lo squilibrio tra osteoblasti e gli osteoclasti porta alla patogenesi e all'eziologia di alcune malattie metaboliche ossee tra cui l'osteoporosi, la malattia di Paget e l'osteopetrosi. Il meccanismo di bilanciamento coinvolge almeno in parte il controllo endocrino da parte di estrogeni e ormone paratiroideo (PTH), nonché il controllo paracrino (autocrino) (*Attanasio et al.*, 2010). Recenti studi hanno confermato il ruolo di glutamina, glutammato e serina quali fattori paracrini (autocrini) endogeni utilizzati nel nostro organismo per le comunicazioni intercellulari nelle cellule ossee inclusi osteoblasti, osteoclasti e osteociti e con un ruolo chiave nei meccanismi associati al mantenimento dell'omeostasi del calcio.

Nel nostro studio, il consumo di acqua effervescente naturale Lete da parte di donne sia in pre- che post-menopausa, con un basso introito di calcio alimentare, è stato in grado di abbassare i livelli di serina, in grado di stimolare l'osteoclastogenesi, ed incrementare quelli di glutamina e glutammato che ostacolando al contrario l'azione degradativa degli osteoclasti.

Dall'insieme dei dati clinici ed ematochimici e dalle analisi metabolomiche mediante spettroscopia NMR del siero delle pazienti è possibile affermare che l'acqua minerale effervescente naturale Lete ricca di calcio, bicarbonati e povera di sodio integra il fabbisogno giornaliero di calcio per la salute delle ossa e per la loro integrità, regolando i meccanismi associati al mantenimento dell'omeostasi del calcio.

Bibliografia

1. Attanasio, R., Borretta, G., Cesareo, R., Dalmaso, A., Dorizzi, R., Frasoldati, A., ... & Zini, M. patologie paratiroidi e delle malattie metaboliche dell'osso.
2. Bacciottini, L., Tanini, A., Falchetti, A., Masi, L., Franceschelli, F., Pampaloni, B., ... & Brandi, M. L. (2004). Calcium bioavailability from a calcium-rich mineral water, with some observations on method. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 38(9), 761-766.
3. Banacos, P. C. (2011). "Box and whisker plots for local climate datasets interpretation and creation using Excel 2007/2010."
4. Beckonert, O., H. C. Keun, T. M. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J. C. Lindon and J. K. J. N. p. Nicholson (2007). "Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts." 2(11): 2692.
5. Böhmer, H., Müller, H., & Resch, K. L. (2000). Calcium supplementation with calcium-rich mineral waters: a systematic review and meta-analysis of its bioavailability. *Osteoporosis international*, 11(11), 938-943.
6. Burckhardt, P. (2008). The effect of the alkali load of mineral water on bone metabolism: interventional studies. *The Journal of nutrition*, 138(2), 435S-437S.
7. Bylesjö, M., M. Rantalainen, O. Cloarec, J. K. Nicholson, E. Holmes and J. J. J. o. C. A. J. o. t. C. S. Trygg (2006). "OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification." 20(8-10): 341-351.
8. Cepollaro, C., Orlandi, G., Gonnelli, S., Ferrucci, G., Arditti, J. C., Borracelli, D., ... & Gennari, C. (1996). Effect of calcium supplementation as a high-calcium mineral water on bone loss in early postmenopausal women. *Calcified tissue international*, 59(4), 238-239.
9. Chatfield, C. and A. J. Collins (2018). Introduction to multivariate analysis, Routledge.
10. Chong, J., M. Yamamoto and J. Xia (2019). "MetaboAnalystR 2.0: From Raw Spectra to Biological Insights." *Metabolites* 9(3): 57.
11. Cowan, R., E. Seidlitz and G. Singh (2012). "Glutamate Signaling in Healthy and Diseased Bone." *Frontiers in Endocrinology* 3: 89.
12. Couzy, F., Kastenmayer, P., Vigo, M., Clough, J., Munoz-Box, R., & Barclay, D. V. (1995). Calcium bioavailability from a calcium-and sulfate-rich mineral water, compared with milk, in young adult women. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1239-1244.

13. Craig, A., O. Cloarec, E. Holmes, J. K. Nicholson and J. C. Lindon (2006). "Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets." *Analytical chemistry* 78(7): 2262-2267.
14. D'Arrigo, G., F. Provenzano, C. Torino, C. Zoccali and G. J. G. I. N. Tripepi (2011). "I test diagnostici e l'analisi della curva ROC." 28(6): 642-647.
15. Davis, D., M. Perlman and R. J. J. o. M. R. London, Series B (1994). "Direct measurements of the dissociation-rate constant for inhibitor-enzyme complexes via the T1ρ and T2 (CPMG) methods." 104(3): 266-275.
16. de Paz-Lugo, P., J. A. Lupiáñez and E. Meléndez-Hevia (2018). "High glycine concentration increases collagen synthesis by articular chondrocytes in vitro: acute glycine deficiency could be an important cause of osteoarthritis." *Amino Acids* 50(10): 1357-1365.
17. Dichiarazione di Helsinki (2013). "Principi etici per la ricerca biomedica che coinvolge gli esseri umani" emendata in occasione della 64° Assemblea della World Medical Association, Evidence, Ottobre 2013/Vol. 5/Issue 10/e1000059 (www.evidence.it).
18. Dumartheray, E. W., Krieg, M. A., & Burckhardt, P. (2007, March). Bicarbonate from mineral water lowers bone resorption even in calcium sufficiency. In *International Congress Series* (Vol. 1297, pp. 303-309). Elsevier.
19. Guéguen, L., & Pointillart, A. (2000). The bioavailability of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(sup2), 119S-136S.
20. Guo, Y., C. Xie, X. Li, J. Yang, T. Yu, R. Zhang, T. Zhang, D. Saxena, M. Snyder, Y. Wu and X. Li (2017). "Succinate and its G-protein-coupled receptor stimulates osteoclastogenesis." *Nature communications* 8: 15621-15621.
21. Heaney, R. P., & Dowell, M. S. (1994). Absorbability of the calcium in a high-calcium mineral water. *Osteoporosis International*, 4(6), 323-324.
22. Heaney, R. P., Weaver, C. M., & Lee Fitzsimmons, M. (1990). Influence of calcium load on absorption fraction. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5(11), 1135-1138.
23. Krzanowski, W. (2000). Principles of multivariate analysis, OUP Oxford.
24. Lombardi, G., C. Di Somma, M. Rubino, A. Faggiano, L. Vuolo, E. Guerra, P. Contaldi, S. Savastano and A. Colao (2011). "The roles of parathyroid hormone in bone remodeling: prospects for novel therapeutics." *J Endocrinol Invest* 34(7 Suppl): 18-22.
25. Lucas, S., Y. Omata, J. Hofmann, M. Böttcher, A. Iljazovic, K. Sarter, O. Albrecht, O. Schulz, B. Krishnacoumar, G. Krönke, M. Herrmann, D. Mougiakakos, T. Strowig, G.

- Schett and M. M. Zaiss (2018). "Short-chain fatty acids regulate systemic bone mass and protect from pathological bone loss." *Nature Communications* 9(1): 55.
26. Massey, L. K., & Whiting, S. J. (1996). Dietary salt, urinary calcium, and bone loss. *Journal of Bone and Mineral Research*, 11(6), 731-736.
27. Ministero della salute. Circolare 10 aprile 2018 Revisione della circolare n.80 dell'8 novembre 1980, recante "Indicazioni per la conduzione degli studi farmaco-tossicologici e clinici delle acque minerali naturali"
28. Ministero della Salute, DGPRE 00014655-P-15.05.2018 Revisione della Circolare n. 80 dell'8 novembre 1980, recante "Indicazioni per la conduzione degli studi farmaco-tossicologici e clinici delle acque minerali naturali"
29. Meunier, P. J., Jenvrin, C., Munoz, F., de la Gueronniere, V., Garnero, P., & Menz, M. (2005). Consumption of a high calcium mineral water lowers biochemical indices of bone remodeling in postmenopausal women with low calcium intake. *Osteoporosis international*, 16(10), 1203-1209.
30. Nordin, B. C. (1997). Calcium and osteoporosis. *Nutrition*, 13(7-8), 664-686.
31. O'Brien, K. O., Abrams, S. A., Stuff, J. E., Liang, L. K., & Welch, T. R. (1996). Variables related to urinary calcium excretion in young girls. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 23(1), 8-12.
32. Ogawa, T., N. Ishida-Kitagawa, A. Tanaka, T. Matsumoto, T. Hirouchi, M. Akimaru, M. Tanihara, K. Yogo and T. Takeya (2006). "A novel role of L-serine (L-Ser) for the expression of nuclear factor of activated T cells (NFAT)2 in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis in vitro." *J Bone Miner Metab* 24(5): 373-379.
33. Pagano, I., Castaldo G., and Rastrelli L. (2018). Appropriate Ca dose from bicarbonate-calcium mineral water as a preventive strategy for osteoporosis. *Pharmacology Online*, 3, 412-419.
34. Pagano, I., Castaldo G., and Rastrelli L. (2019). Role of calcium from mineral waters during pregnancy. *Pharmacology Online*, 1, 361-365.
35. Panel, C. D. (1994). Optimal calcium intake. NIH Consensus Conference. *JAMA*, 272, 1942-1948.

36. Pang, Z., J. Chong, G. Zhou, D. A. de Lima Morais, L. Chang, M. Barrette, C. Gauthier, P.-É. Jacques, S. Li and J. J. N. a. r. Xia (2021). "MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights."
37. Peacock, M. (2010). Calcium metabolism in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(Supplement 1), S23-S30.
38. Pell, G. S., R. S. Briellmann, A. B. Waites, D. F. Abbott, D. P. Lewis and G. D. J. J. o. M. R. I. A. O. J. o. t. I. S. f. M. R. i. M. Jackson (2006). "Optimized clinical T2 relaxometry with a standard CPMG sequence." 23(2): 248-252.
39. Prince, R. L., Devine, A., Dhaliwal, S. S., & Dick, I. M. (2006). Effects of calcium supplementation on clinical fracture and bone structure: results of a 5-year, double-blind, placebo-controlled trial in elderly women. *Archives of internal medicine*, 166(8), 869-875.
40. Psychogios, N., D. D. Hau, J. Peng, A. C. Guo, R. Mandal, S. Bouatra, I. Sinelnikov, R. Krishnamurthy, R. Eisner and B. Gautam (2011). "The human serum metabolome." *PloS one* 6(2): e16957.
41. Quattrini, S., Pampaloni, B., & Brandi, M. L. (2016). Natural mineral waters: chemical characteristics and health effects. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 13(3), 173.
42. Raman, S. S., R. Parthasarathi, V. Subramanian and T. Ramasami (2006). "Role of aspartic acid in collagen structure and stability: A molecular dynamics investigation." *J Phys Chem B* 110(41): 20678-20685.
43. Ravanbakhsh, S., P. Liu, T. C. Bjordahl, R. Mandal, J. R. Grant, M. Wilson, R. Eisner, I. Sinelnikov, X. Hu and C. J. P. o. Luchinat (2015). "Accurate, fully-automated NMR spectral profiling for metabolomics." 10(5): e0124219.
44. Shatenstein, B., Nadon, S., Godin, C., & Ferland, G. (2005). Development and validation of a food frequency questionnaire. *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research*, 66(2), 67-75.
45. Suzuki, A. and J. Iwata (2021). "Amino acid metabolism and autophagy in skeletal development and homeostasis." *Bone* 146: 115881.
46. Takarada, T., M. Takarada-Iemata, Y. Takahata, D. Yamada, T. Yamamoto, Y. Nakamura, E. Hinoi and Y. Yoneda (2012). "Osteoclastogenesis is negatively regulated by D-serine produced by osteoblasts." *J Cell Physiol* 227(10): 3477-3487.
47. Theobald, H. E. (2005). Dietary calcium and health. *Nutrition Bulletin*, 30(3), 237-277.

48. Teucher, B., J. R. Dainty, C. A. Spinks, G. Majsak-Newman, D. J. Berry, J. A. Hoogewerff, R. J. Foxall, J. Jakobsen, K. D. Cashman, A. Flynn and S. J. Fairweather-Tait (2008). "Sodium and bone health: impact of moderately high and low salt intakes on calcium metabolism in postmenopausal women." *J Bone Miner Res* 23(9): 1477-1485.
49. Verma, K. (2013). Base of a research: good clinical practice in clinical trials. *J Clin Trials*, 3(1), 100-28.
50. Wachman, A., & Bernstein, D. (1968). Diet and osteoporosis. *The Lancet*, 291(7549), 958-959.
51. Wynn, E., Krieg, M. A., Aeschlimann, J. M., & Burckhardt, P. (2009). Alkaline mineral water lowers bone resorption even in calcium sufficiency:: Alkaline mineral water and bone metabolism. *Bone*, 44(1), 120-124.
52. Xia, J., N. Psychogios, N. Young and D. S. Wishart (2009). "MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation." *Nucleic acids research* 37(suppl_2): W652-W660.
53. Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature protocols*, 6(6), 743-760.
54. Ye, S. K., Ren, X., Meng, X. X., & Chen, H. Y. (2020). Comparison of different calcium supplementation methods in patients with osteoporosis. *Experimental and therapeutic medicine*, 19(2), 1432-1438.

Fisciano (SA) 18/12 /2021

Il Responsabile dello Studio

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Luca Rastrelli".

Prof. Luca Rastrelli

Dipartimento di Farmacia

Università degli Studi di Salerno

Tel: +39-089-969766; 3381693414

e-mail: rastrelli@unisa.it