

Sistema Terapeutico Biointegrato



MIRATO

TRIGNO M®

azione antineoplastica *in vitro*
coadiuvante le terapie oncologiche mirate



DRENANTE

TRIGNO D®

azione di drenaggio in corso di terapia oncologica



DI TERRENO

TRIGNO T®

azione di sostegno del terreno costituzionale
nel paziente oncologico

TRIGNO M®

Formulazione: soluzione per os, flacone 100 mL.

Composizione: Estratto *Prunus spinosa* L. qualità *trigno* PsT® + CAN (miscela complessa di aminoacidi, vitamine e sali minerali) come da brevetto N° 0001429242.

Proprietà: azione antiproliferativa e apoptotica, *in vitro*, su linee cellulari tumorali.

Indicazioni: come coadiuvante nelle problematiche tumorali, in trattamento oncologico mirato.

Posologia: 5-10 mL al giorno, lontano dai pasti.

Effetti collaterali e indesiderati: ad oggi non sono state segnalate reazioni avverse ai componenti del TRIGNO M®.

Interazioni: ad oggi non si conoscono né sono state segnalate interazioni farmacologiche con i componenti del TRIGNO M®.

TRIGNO D®

Formulazione: gocce per os, flacone da 50 mL.

Composizione: *Prunus spinosa* L. qualità *trigno* PsT® gemme.

Proprietà: disintossicante, drenante, di riattivazione del ricambio, antinfiammatoria, tonica e stimolante, modulante l'asse ipotalamo-ipofiso-surrenalico, antidepressiva.

Indicazioni: drenaggio tossinico in tutte le problematiche oncologiche, in trattamento con chemioterapia e radioterapia, in fase pre e post chirurgica; in tutte le condizioni in cui necessita un'azione drenante e disintossicante dell'organismo; problematiche di ricambio; ritenzione idrica; edemi di origine renale o cardiaca; stati di debilitazione da malattie, da intossicazione, da stress; convalescenze prolungate; disfunzioni dell'asse ormonale ipotalamo-ipofiso-surrenalico; stati depressivi.

Posologia: 30 gocce da due a tre volte al dì, lontano dai pasti.

Effetti collaterali e indesiderati: ad oggi non sono state segnalate reazioni avverse ai componenti del TRIGNO D®.

Interazioni: ad oggi non si conoscono, né sono state segnalate, interazioni farmacologiche con i componenti del TRIGNO D®.

TRIGNO T®

Formulazione: soluzione per os, flacone da 200 mL.

Composizione: *Prunus spinosa* L. qualità *trigno* fructus.

Proprietà: azione tonica, antidepressiva, astringente.

Indicazioni: sostegno del terreno costituzionale nelle problematiche oncologiche, astenia, stati depressivi.

Posologia: 15 mL al giorno, lontano dai pasti.

Effetti collaterali e indesiderati: ad oggi non sono state segnalate reazioni avverse ai componenti del TRIGNO T®.

Interazioni: ad oggi non si conoscono, né sono state segnalate, interazioni farmacologiche con i componenti del TRIGNO T®.

Notifica Ministero della Salute: cod. 80011

Notifica Ministero della Salute: cod. 77067

Notifica Ministero della Salute: cod. 77066

Trigno



Terapia biointegrata per le problematiche oncologiche



Cod. Paraf.: Trigno M 935504225
Cod. Paraf.: Trigno D 935187334
Cod. Paraf.: Trigno T 935197703



Biogroup SpA Società Benefit
Variante esterna, snc
86091 Bagnoli del Trigno (Is)
Tel. +39 0874 870014
Fax +39 0874 1865244
www.biogroup.it
info@biogroup.it



ATTESTATO DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

N. 0001429242

Il presente brevetto viene concesso per l'invenzione della domanda sotto specificata:

num. domanda	anno	C.C.I.A.A.	data pres. domanda	classifica
000133	2015	ROMA	01/04/2015	A61K45/06

TITOLO ESTRATTI DI PRUNUS SPINOSA AD ATTIVITA' ANTITUMORALE

Publicazione riservata ai medici e agli operatori del settore. © Sigmasstudio 2017 - P4-TRIGNO-1-2017



Trigno



Terapia biointegrata per le problematiche oncologiche



Cytotoxic and Apoptotic Activities of *Prunus spinosa* Trigno Ecotype Extract on Human Cancer Cells

Abstract: The aim of this work was to demonstrate that a natural compound, not-toxic to normal cells, has cytotoxic and sensitizing effects on carcinoma cells, with the final goal of combining it with chemotherapeutic drugs to reduce the overall dose. *Prunus spinosa* Trigno ecotype (PsT) drupe extract with a nutraceutical activator complex (NAC) made of amino acids, vitamins and mineral salt blends, has shown in vitro anticancer activity. The cytotoxic effect of (PsT + NAC)[®] has been evaluated on human cancer cells, with an initial screening with colorectal, uterine cervical, and bronchoalveolar cells, and a subsequent focus on colon carcinoma cells HCT116 and SW480. The viability reduction of HCT116 and SW480 after treatment with (PsT 10 mg/mL + NAC)[®] was about 40% ($p < 0.05$), compared to control cells. The cell's survival reduction was ineffective when the drug vehicle (NAC) was replaced with a phosphate buffer saline (PBS) or physiological solution (PS). The flow cytometry evaluation of cancer cells' mitochondrial membrane potential showed an increase of 20% depolarized mitochondria. Cell cycle analysis showed a sub G1 (Gap 1 phase) peak appearance (HCT116: 35.1%; SW480: 11.6%), indicating apoptotic cell death induction that was confirmed by Annexin V assay (HCT116: 86%; SW480: 96%). Normal cells were not altered by (PsT + NAC)[®] treatments.

Attività citotossica e apoptosica dell'estratto di *Prunus spinosa* L. ecotype TRIGNO su cellule tumorali umane

Dr.ssa Stefania Meschini, con la collaborazione della Dr.ssa Maria Condello e Evelin Pellegrini

Reparto di Metodi Ultrastrutturali per Terapie Antitumorali Istituto Superiore di Sanità

Il lavoro è stato condotto sui fitocomplessi estratti da drupe di PsT[®] raccolte nell'area del bacino idrografico del fiume Trigno. Tali frutti sono stati prelevati da piante spontanee e da arbusti coltivati secondo modalità di agricoltura biologica. I fitocomplessi di PsT[®] sono stati estratti attraverso una lunga macerazione in alcol etilico, seguita dalla torchiatura dei frutti. Il liquido ottenuto, decantato e filtrato, è stato quindi concentrato. L'estratto così ottenuto, consistente in una soluzione idroalcolica con concentrazione del fitocomplesso (fc) pari a 86 mg/mL (P86), è stato impiegato tal quale ovvero diluito progressivamente con CAN (miscela complessa di aminoacidi, vitamine e sali minerali) in 9 soluzioni derivate (P50= 50mg/mL fc + 50 mg/mL CAN; P10= 10 mg/mL fc + 90 mg/mL CAN; P5= 5 mg/mL fc + 95 mg/mL CAN; P4,5= 4,5 mg/mL fc + 95,5 mg/mL CAN; P4= 4 mg/mL fc + 96 mg/mL CAN; P2= 2 mg/mL fc + 98 mg/mL CAN; P1= 1 mg/mL fc + 99 mg/mL CAN; P0,5= 0,5 mg/mL fc + 99,5 mg/mL CAN; P0,1= 0,1 mg/mL fc + 99,9 mg/mL CAN).

Le soluzioni sono state utilizzate nei seguenti esperimenti:

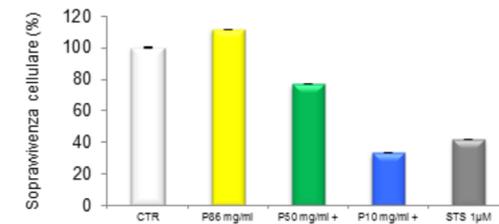
- Test di valutazione dell'attività antiproliferativa cellulare (MTT Assay).
- Test di clonogenicità cellulare.
- Curve di crescita cellulare e osservazioni in Microscopia a contrasto di fase.



a) Test di valutazione dell'attività antiproliferativa cellulare (MTT Assay)

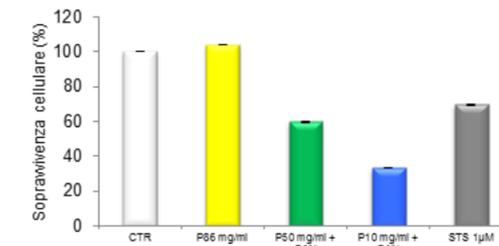
La prova è stata condotta impiegando tutte le soluzioni fc/CAN per un periodo di 24 ore. Dato che i saggi riguardanti le soluzioni P5w; P4,5; P4; P2; P1; P0,5; P0,1 sono risultati negativi, i relativi resoconti sono stati omessi.

Cellule di carcinoma del colon ceppo HCT116



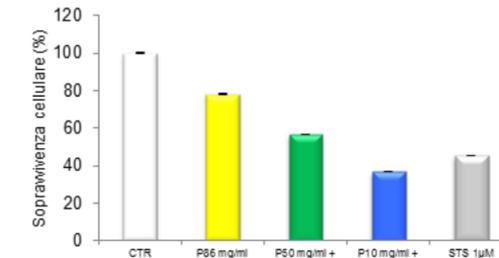
Il grafico dimostra che il *Prunus spinosa* L. qualità *trigno* assoluto (P86) non produce alcuna alterazione alla sopravvivenza cellulare nelle cellule di carcinoma del colon HCT116, come peraltro non sono state riscontrate differenze significative nei confronti fra il controllo e i trattamenti con le soluzioni P5, P4, P2, P1, P0,5, P0,1 (non riportate nel grafico). Contrariamente, le soluzioni P50 + CAN e P10 + CAN riducono la sopravvivenza cellulare delle cellule tumorali. L'efficacia del PsT[®] + CAN è maggiore particolarmente dopo il trattamento con P10 + CAN che, nel caso specifico, è più efficace della stessa Staurosporina, induttore di morte cellulare.

Cellule di adenocarcinoma del colon ceppo SW480



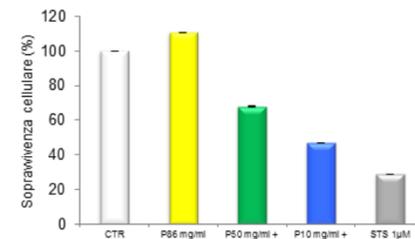
Anche in questo caso il *Prunus spinosa* L. qualità *trigno* assoluto (P86) nonché le soluzioni P5, P4, P2, P1, P0,5, P0,1 (non riportate nel grafico), non alterano in maniera significativa la sopravvivenza cellulare della linea SW480 esaminata. Al contrario, le concentrazioni P50 + CAN e P10 + CAN riducono la sopravvivenza cellulare in maniera significativa.

Cellule di adenocarcinoma broncoalveolare A549



La figura evidenzia che l'estratto di *Prunus spinosa* L. qual. *trigno* assoluto (P86) diminuisce moderatamente la sopravvivenza delle cellule di adenocarcinoma broncoalveolare A549. Con le soluzioni P5, P4, P2, P1, P0,5, P0,1 non abbiamo osservato alcuna differenza nella sopravvivenza cellulare rispetto alle cellule di controllo (dati non riportati nel grafico). Anche in questo fenotipo tumorale, gli estratti di PsT[®] a concentrazione P50 + CAN e P10 + CAN riducono significativamente la sopravvivenza cellulare particolarmente evidente nel trattamento con P10 + CAN.

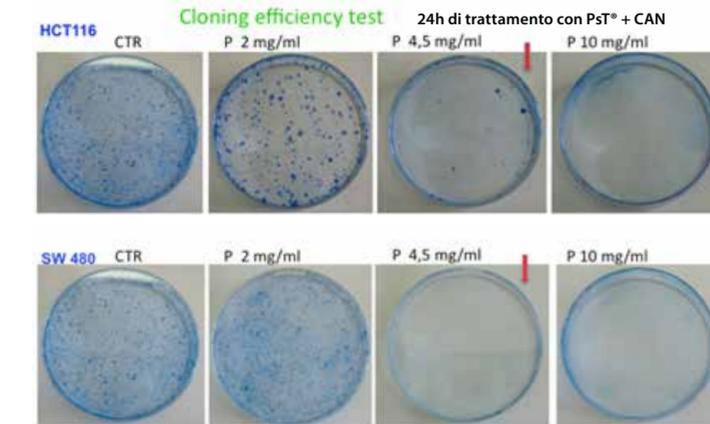
Cellule tumorali della cervice uterina HeLa



Le concentrazioni molto basse di *Prunus spinosa* L. qualità *trigno* quali P5, P4, P2, P1, P0,5, P0,1 (non riportate nel grafico) si sono dimostrate inefficaci sulla inibizione della proliferazione delle cellule tumorali come il trattamento con la soluzione assoluta di P86. Le soluzioni diluite con P50 + CAN e ancor più, P10 + CAN dimostrano invece, di ridurre la crescita delle cellule tumorali della cervice uterina HeLa.

b) Test di clonogenicità cellulare

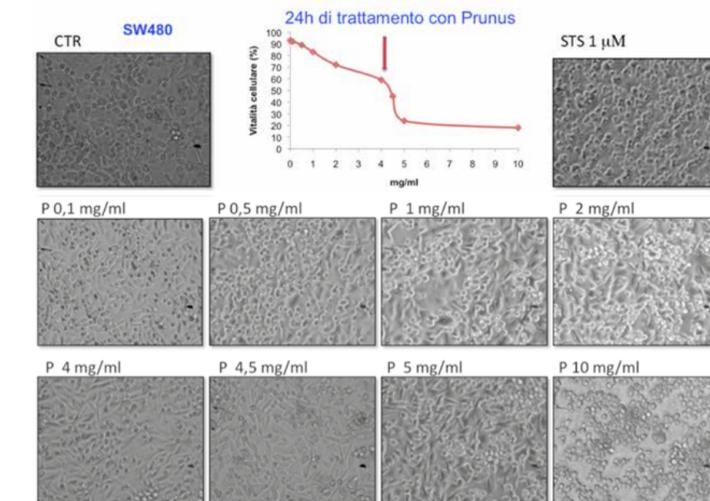
Qui è stata valutata la citotossicità degli estratti di PsT[®] (soluzioni P2; P4,5 e P10) utilizzando un saggio di efficienza clonale.



La figura mostra che i fitocomplessi contenuti nel PsT[®] + CAN sono in grado di inibire la crescita cellulare in maniera dose dipendente in entrambe le linee tumorali. Il test ha permesso anche di valutare la concentrazione in grado di inibire completamente lo sviluppo dei cloni cellulari. Sia nella linea cellulare HCT116, quanto nella linea SW480, la soluzione P4,5 costituisce la concentrazione minima in fitocomplessi di PsT[®] in associazione al CAN in grado di inibire completamente nella linea SW480 la riproduzione cellulare.

c) Analisi della crescita cellulare e osservazioni in Microscopia a contrasto di fase

Grazie a queste prove è stato possibile osservare i cambiamenti morfologici indotti dalla somministrazione di estratti di PsT[®] addizionati di CAN a colture di cellule tumorali intestinali ceppi HCT116 e SW480. Le soluzioni testate sono state: P0,1; P0,5; P1; P2; P4; P4,5; P5 e P10. I risultati ottenuti sono stati confrontati col controllo cellulare e con una linea trattata con Staurosporina (1 µM), induttore di apoptosi.



Osservazioni al Microscopio Ottico in contrasto di fase delle modificazioni morfologiche indotte dal trattamento con diverse concentrazioni di *Prunus spinosa* L. qualità *trigno* addizionato di CAN per 24 ore sulle cellule tumorali intestinali SW480.

Come si può osservare dalla figura, all'aumentare della concentrazione le cellule trattate con PsT[®] + CAN sono rigonfie, retratte e meno confluenti rispetto al controllo. L'analisi delle curve di crescita dimostra lo stesso effetto degli esperimenti precedenti.