

PROTOCOLLO

TITOLO

Studio in doppio-cieco verso placebo, randomizzato, a gruppi paralleli, monocentrico dell'effetto di un estratto di *Epilobium angustifolium* L. a elevato contenuto di enoteina B sull'Ipertrofia Prostatica Benigna (IPB).

Il sottoscritto conferma che condurrà lo studio secondo le condizioni descritte nel protocollo.

Cognome e nome	Indirizzo	Telefono
Dott. Giuseppe Buonomo	Via Martorano 82019 Sant'Agata de' Goti (BN)	+39 3331116150

Sommario

<u>PREMESSA</u>	3
<u>RAZIONALE</u>	4
<u>OBIETTIVO DELLO STUDIO</u>	6
<u>TIPO DI STUDIO</u>	6
<u>POPOLAZIONE E NUMEROSITA' CAMPIONARIA</u>	7
<u>DURATA DELLO STUDIO</u>	10
<u>TRATTAMENTI IN STUDIO</u>	10
<u>CRITERI DI INCLUSIONE</u>	10
<u>CRITERI DI ESCLUSIONE</u>	10
<u>METODI</u>	11
<u>RISCHI E BENEFICI</u>	12
<u>EVENTI AVVERSI</u>	13
<u>OUTCOME PRIMARI E SECONDARI</u>	13
<u>INFORMAZIONE AL PAZIENTE E CONSENSO INFORMATO</u>	13
<u>CONSENSO INFORMATO</u>	13
<u>PROTEZIONE DEI PAZIENTI ARRUOLATI</u>	13
<u>SPERIMENTATORE PRINCIPALE</u>	14
<u>CENTRI PARTECIPANTI</u>	14
<u>RISERVATEZZA DEI DATI</u>	14

PREMESSA

L'Epilobio, comunemente usato nella medicina tradizionale per la funzionalità della prostata, è impiegato nel trattamento delle prime fasi dell'iperplasia prostatica benigna, ed è incluso nella lista dei botanicals ammessi quali ingredienti di integratori alimentari ai sensi del DM 10 agosto 2018 - Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali (allegato 1). I componenti attivi responsabili dell'azione sulla prostata sono l'enotenina A, l'enoteina B e l'ellagitannina dimerico-macro ciclica, ma si annoverano molti altri costituenti come l'acido chinico, l'acido malico, l'acido gallico, gli acidi idrossicinnaminici, e i flavonoli (miricetina esoside, quercetina esoside gallato). Il costituente dominante è l'enoteina B, responsabile degli effetti benefici degli estratti, ma a causa della discutibile biodisponibilità di quest'ultima, l'effettiva efficacia *in vivo* dell'estratto di Epilobio rimane da chiarire.

Nel 2013 Stolarczyk e colleghi hanno dimostrato che l'estratto di tre differenti specie di Epilobio (*Epilobium angustifolium*, *Epilobium parviflorum* and *Epilobium hirsutum*) ha un potente effetto inibitorio nei confronti della proliferazione di cellule prostatiche LNCap di carcinoma prostatico metastatico e che l'estratto sottoposto a fermentazione simulata *in vitro* risulta in grado di inibire la secrezione da parte delle cellule del PSA. (1) Nel 2017 è stato condotto uno studio che ha posto l'attenzione sulla comparazione dell'attività *in vitro* e *in vivo* dell'estratto acquoso di *Epilobium angustifolium* sulla proliferazione delle cellule del cancro alla prostata (LNCaP). (2) L'incubazione di diverse linee cellulari con l'estratto acquoso di *E. angustifolium* ha comportato una significativa riduzione della proliferazione delle cellule PZ-HPV-7 e LNCaP, parzialmente associate all'attività antiandrogenica. Questi effetti sono stati ascritti alla presenza nell'estratto di enoteina B, esaminata in parallelo come singolo composto. Per quanto riguarda gli studi *in vivo*, è stato osservato che la supplementazione orale con estratto acquoso di *E. angustifolium* 50-200 mg/kg in ratti impiantati con cellule LNCaP, comporta una riduzione dei casi di adenoma prostatico fino al 13%. Nei volontari umani, invece, a cui era stato somministrato Epilobio come tè, nelle feci e nell'urina sono stati evidenziati dei coniugati dell'urolitina (metaboliti della microflora umana derivati dall'acido ellagico). Nonostante siano stati ottenuti risultati promettenti, è ancora da chiarire il ruolo dell'enoteina B sull'attività dell'estratto acquoso di *E. angustifolium*.

1. Stolarczyk M, Piwowarski JP, Granica S, Stefańska J, Naruszewicz M, Kiss AK. Extracts from *Epilobium* sp. Herbs, Their Components and Gut Microbiota Metabolites of *Epilobium* Ellagitannins, Urolithins, Inhibit Hormone-Dependent Prostate Cancer Cells- (LNCaP) Proliferation and PSA Secretion. *Phytother. Res.* 2013; 27: 1842–1848.
2. Jakub P. Piwowarski, Barbara Bobrowska-Korczak, Iwona Stanisławska, Wojciech Bielecki, Robert Wrzesien, Sebastian Granica, Katarzyna Krupa, Anna K. Kiss. Evaluation of the Effect of *Epilobium angustifolium* Aqueous Extract on LNCaP Cell Proliferation in In Vitro and In Vivo Models. *Planta Med* 2017; 83(14/15): 1159-1168

RAZIONALE

L'American Urological Association (AUA) Guideline nel 2010 ([https://www.auanet.org/benign-prostatic-hyperplasia-\(2010-reviewed-and-validity-confirmed-2014\)](https://www.auanet.org/benign-prostatic-hyperplasia-(2010-reviewed-and-validity-confirmed-2014))) ha definito l'ipertrofia prostatica benigna (IPB) come una proliferazione della muscolatura liscia e delle cellule epiteliali all'interno della zona di transizione prostatica. (1,2) Clinicamente è caratterizzata da frequenza urinaria, nicturia, emissione di urina a intermittenza, debole flusso urinario, esitazione minzionale, e residuo vescicale post-minzionale. L'eziologia esatta è sconosciuta. Tuttavia, la somiglianza tra l'IPB e la morfogenesi embrionale della prostata ha condotto all'ipotesi che l'IPB possa derivare da un "risveglio" nell'età adulta dei processi di induzione embrionale. L'aumento del volume della prostata (*Benign Prostatic Enlargement-BPE*) contribuisce alla sintomatologia del tratto urinario inferiore (LUTS- *Lower Urinary Tract Symptoms*) attraverso almeno due vie: 1) ostruzione cervico- uretrale (*Bladder Outlet Obstruction-BOO*) (componente statica), e 2) aumento del tono della muscolatura liscia e dalla resistenza che si crea all'interno della ghiandola ingrossata (componente dinamica). I fattori implicati nella patogenesi sono spesso coinvolti nella progressione sia della sintomatologia sia della malattia stessa. Il progetto *BPH Urologic Diseases in America* ha esaminato l'incidenza dei LUTS da moderati a severi riportati in studi statunitensi che si erano basati su una popolazione che presentava un punteggio nella scala sintomatologica dell'American Urological Association (AUA) *Symptom Index* (SI) ≥ 7 . (3) I risultati dello studio hanno mostrato un progressivo aumento dell'incidenza dei LUTS da moderati a severi del 50% nell'ottavo decennio di vita. L'incidenza dei LUTS da moderati a gravi è stata anche associata allo sviluppo di ritenzione urinaria acuta (AUR) come sintomo della progressione dell'IPB. Un altro studio ha stimato che il 90% degli uomini tra i 45 e gli 80 anni soffre di qualche tipo di LUTS. (4)

Il genere *Epilobium* (*Onagraceae*) consiste di circa 200 specie distribuite in tutto il mondo (5), e in Europa ne esistono ventisette specie diverse (6). Sulla base dei dati disponibili da varie fonti di letteratura, supportati dai dati della presenza sul mercato di questa pianta e dei suoi prodotti medicinali, i requisiti legali per l'uso tradizionale sono considerati soddisfatti per la sostanza vegetale sminuzzata come tisana per uso orale nel sollievo dai sintomi del tratto urinario inferiore correlati a iperplasia prostatica benigna.

Come riportato nella monografia dell'Unione europea sull'*Epilobium angustifolium* e l'*Epilobium parviflorum* (www.ema.europa.eu/documents/herbal-report/final-assessment-report-epilobium-angustifolium-l/epilobium-parviflorum-schreb-herba_en.pdf), dall'inizio degli anni '80 l'uso medicinale delle parti aeree di queste due piante è diventato molto popolare in diversi paesi europei per il trattamento dell'iperplasia prostatica benigna e dei disturbi della vescica o dei reni (7-15). Inoltre, *Epilobium angustifolium* e/o *Epilobium parviflorum* sono anche menzionati come piante medicinali tradizionali in diversi libri di testo di fitoterapia per il trattamento di sintomi correlati a iperplasia prostatica benigna (16-19).

1. Lee C, Kozlowski J, Grayhack J: Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate* 1997; 31: 131.
2. Auffenberg G, Helfan B, McVary K: Established medical therapy for benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* 2009; 36: 443.
3. Wei J, Calhoun E, Jacobsen S: Urologic diseases in America project: benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2005; 173: 1256.
4. McVary K: BPH: Epidemiology and Comorbidities. *Am J Manag Care* 12 2006; 5 Suppl: S122.
5. Granica S, Piwowarski JP, Czerwinska ME, Kiss AK. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (*Onagraceae*): A review. *J Ethnopharmacol* 2014, 156:316-346

6. Saukel H. Pharmakobotanische Untersuchungen von Arzneidrogen II. Herba Epilobii. 1. Mitteilung. Sci Pharm 1982, 50:179-200.
7. Wichtl M, Tadros W. Weidenröschen-Tee: Ein Beitrag zur Untersuchung. Dtsch Apoth Ztg 1982, 122(50):2593-2598.
8. Wichtl M. Teedrogen. Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1984
9. Wichtl M. Teedrogen und Phytopharmaka. 5th ed. Wiss. VerlagsgesmbH, Stuttgart 2009.
10. Schilcher H. Bedeutung von Arzneipflanzen und Phytopharmaka in der Bundesrepublik Deutschland. Pharmazeutische Zeitung 1982, 127(41): 2174-2179.
11. Schilcher H. Pflanzliche Urologika, Dtsch Apoth Ztg 1984, 124(47):2429-2436.
12. Saukel H. Pharmakobotanische Untersuchungen von Arzneidrogen II. Herba Epilobii. 1. Mitteilung. Sci Pharm 1982, 50:179-200.
13. Hiermann A, Juan H, Sametz W. Die phytochemische Untersuchung von Epilobium-Infusen und deren Einfluss auf die Prostaglandinsynthese. Farmaceutisch Tijdschrift voor Belgie 1984, 61(3):282.
14. Lachinger M. Untersuchung von Inhaltsstoffen einheimischer Epilobium-Arten. Master Thesis, University of Vienna 2004.
15. S. Wissenschaftliche Reflexionen über traditionelle Arzneimittel in Österreich. PhD Thesis, University of Vienna 2007.
16. Jänicke C, Grünwald J, Brendler T. Weidenröschen – Epilobium angustifolium. In Handbuch Phytotherapie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2003, 558-559.
17. Van Wyk BE, Wink C, Wink M. Epilobium parviflorum. In Handbuch der Arzneipflanzen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2004, 135.
18. Frohne D. Epilobium parviflorum u.a. kleinblütige Arten – Kleinblütiges Weidenröschen. In Heilpflanzenlexikon. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2006, 211.
19. Schilcher H, Kammerer S, Wegener T. Leitfaden Phytotherapie. Elsevier GmbH, München 2010.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Lo studio ha lo scopo di valutare se l'assunzione giornaliera di un estratto di *E. angustifolium* a elevato contenuto di enoteina B per la durata di almeno 5 mesi possa consentire un significativo miglioramento dei sintomi, e il ripristino o un miglioramento del flusso urinario in soggetti con lieve/moderata IPB, diagnosticata attraverso:

- 1) valutazione del residuo vescicale post-minzionale e del volume (e peso) della prostata mediante ecografia prostatica;
- 2) dosaggio del PSA (antigene prostatico specifico; rapporto neutrofili/linfociti; punteggio sintomatologico IPSS (*International Prostatic Symptoms Score*) assegnato dal soggetto mediante risposta a quesiti riguardanti lo svuotamento incompleto della vescica, la frequenza e l'urgenza della minzione, l'esitazione minzionale, la spinta e colatura nella minzione, il flusso di urina debole e la nicturia, e la qualità della vita percepita (un punteggio da 0 a 7 indica una sintomatologia lieve, da 8 a 19 indica una sintomatologia moderata e da 20 a 35 indica una sintomatologia grave, come riportato da Barry et al: "The American Urological Association Symptom Index for benign prostatic hyperplasia." *Journal of Urology* 148:1549, 1992.).

TIPO DI STUDIO

Verrà condotto uno studio controllato, randomizzato, in doppio cieco verso placebo, a gruppi paralleli, monocentrico secondo lo schema riportato in figura 1.

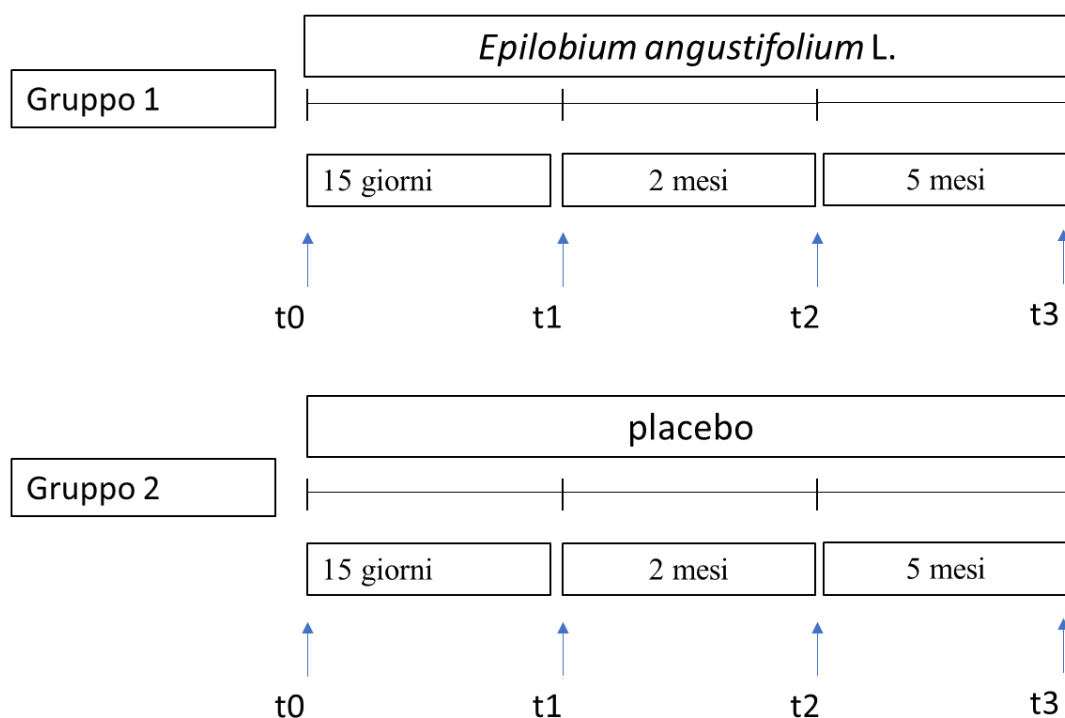


Figura 1. Tipo di studio adottato

POPOLAZIONE E NUMEROSITA' CAMPIONARIA

Lo studio prevede di reclutare 130 soggetti maschi:

- 1) di età superiore a 45 anni
- 2) affetti da ipertrofia prostatica benigna

Ai soggetti reclutati, verrà somministrata per la durata di sei mesi, una capsula gastroresistente al giorno contenente 0,5 g di estratto di epilobio, corrispondente a 2 g di parti aeree di *E. angustifolium*, o di placebo. Tale dose è stata calcolata considerando la resa dell'estrazione, che è circa il 25%, e le indicazioni dell'*Assessment report on Epilobium angustifolium L. and/or Epilobium parviflorum Schreb., herba* (European Medicines Agency, 2016. 24 November 2015 EMA/HMPC/712510/2014 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)).

Dimensione del campione

	Descrizione
Studio	Effetto dell'epilobio in pazienti affetti da ipertrofia prostatica benigna
Disegno sperimentale	Due bracci: trattamento con placebo (CTRL) e trattamento con epilobio (EPLB) con misurazione delle variabili di risposta ai tempi sottoriportati in riferimento alla figura 1. Variabili di risposta: • volume urinario residuo (t0, t3) • volume e peso della prostata (t0, t3) • punteggio del questionario IPSS (ogni 15 giorni dal reclutamento) • PSA (t0, t2, t3) • rapporto neutrofili/linfociti (t0, t2, t3)
Obiettivo del report	individuare la dimensione campionaria (numero di pazienti ottimale) per lo studio in oggetto.

Analisi statistica	Il disegno sperimentale più adatto per lo studio in esame è un modello di analisi della varianza per misure ripetute con effetti entro soggetto e tra soggetti (<i>F test - ANOVA repeated measures, within-between effects</i>) Variabile di risposta: • volume e peso della prostata • volume urinario residuo • PSA • rapporto neutrofili/linfociti • punteggio IPSS I fattori utilizzati nell' analisi sono: • Effetto tra soggetti (<i>between effect</i>): trattamento (fattore a 2 livelli: CTRL e EPLB) • Effetto entro soggetto (<i>within effect</i>): misurazione (fattore a 3 livelli: t0, t2,t3)
Power analysis	Si assume un disegno bilanciato (lo stesso numero di pazienti per combinazione dei fattori) La stima dell'effect size è stata condotta separatamente per le tre variabili di risposta considerate. • Volume della prostata: Non sono disponibili pregressi sull'effetto di epilobio sulla riduzione del peso e volume della prostata tali da permettere una stima di effect size. Sono stati quindi adottati i valori proposti da Cohen (1969): effetto piccolo 0.10, effetto medio 0.25, effetto grande 0.40. • Volume urinario residuo: Anche in questo caso non sono disponibili dati pregressi per poter stimare un valore di effect size. Sono stati utilizzati gli stessi valori indicati per il volume della prostata. Punteggio IPSS: è stato utilizzato il lavoro di Coulson et al. (2013) in cui si è misurato l'effetto di una miscela di principi contenenti anche epilobio sulla riduzione dello score IPSS rispetto a un controllo. I dati forniti indicano una riduzione del 36% nel gruppo trattato e dell'8% nel controllo. Questo porta a stimare un differenziale del 28%, che è stato utilizzato come valore di partial η^2. La stima di effect size corrispondente è di 0.62. Considerato però che nel presente studio l'epilobio viene somministrato singolarmente, si è deciso di considerare anche un valore più conservativo di effect size pari al 50% di quello dedotto dallo studio di Coulson et al. (2013), cioè 0.31. Sono stati scelti due valori di correlazione entro soggetto: $r=0$ (assenza di correlazione tra misure entro soggetto) e $r=0.5$ (presenza di correlazione tra misure entro paziente). I calcoli di dimensione campionaria sono stati effettuati con tre valori di potenza $1-\beta$ pari a 0.80, 0.95 e 0.99 e livello di significatività $\alpha = 0.05$.

Bibliografia	Cohen, J. 1969. Statistical power analysis for the behavioural sciences. New York: Academic Press. Coulson et al. 2013. A phase II randomised double-blind placebo-controlled clinical trial investigating the efficacy and safety of ProstateEZE Max: A herbal medicine preparation for the management of symptoms of benign prostatic hypertrophy. Complementary Therapies in Medicine 21, 172-179.
---------------------	---

Nelle seguenti tabelle si riportano le dimensioni campionarie totale (CTRL+EPLB) per le diverse ipotesi di potenza ed effect size:

Peso e Volume della prostata e volume urinario residuo

Effect size	r	(1-β)= 0.99 α =0.05	(1-β)= 0.95 α =0.05	(1-β)= 0.80 α =0.05
Large (0.40)	0	60	44	28
	0.5	30	24	16
Medium (0.25)	0	150	106	66
	0.5	75	54	34
Small (0.10)	0	922	650	396
	0.5	462	328	200

Punteggio IPPS

Effect size	R	(1-β)= 0.99 α =0.05	(1-β)= 0.95 α =0.05	(1-β)= 0.80 α =0.05
Da Coulson et al. 2013 (0.62)	0	28	20	14
	0.5	16	12	8
Modificato da Coulson et al. 2013 (0.31)	0	98	70	44
	0.5	50	36	24

Tenendo conto della numerosità prevista per lo studio si ritiene adeguato il numero pari a 130 pazienti in totale.

DURATA DELLO STUDIO

Lo studio inizierà dopo parere positivo del Comitato Etico, e terminerà dopo che sarà stato arruolato l'ultimo soggetto e che saranno state eseguite le ultime analisi.

I soggetti potranno, in qualsiasi momento, ritirarsi dallo studio senza dare alcuna motivazione.

I soggetti dovranno essere esclusi dallo studio nel caso si verifichino i seguenti casi:

- ritiro del consenso da parte del soggetto;
- quando si verifica un criterio di esclusione clinicamente rilevante che può influenzare la salute del soggetto;
- non-compliance del soggetto con il protocollo;
- decisione dello sperimentatore principale;

Se il soggetto non si attiene alle indicazioni dello studio, lo sperimentatore dovrà determinarne le ragioni e le circostanze in modo accurato e completo.

TRATTAMENTI IN STUDIO

Lo studio clinico prevede l'assunzione da parte dei soggetti reclutati di una capsula gastroresistente al giorno, di *Epilobium angustifolium L.* o di placebo per la durata di almeno 5 mesi.

Lo studio clinico non prevede che vengano svolti altri trattamenti con integratori alimentari o alimenti funzionali e/o terapie farmacologiche.

CRITERI DI INCLUSIONE

Sulla base dei lavori pubblicati in letteratura, per valutare l'effetto dell'integratore a base di *Epilobium angustifolium L.*, i soggetti da reclutare, che dovranno essere autosufficienti e avere propensione alla collaborazione, dovranno possedere le seguenti caratteristiche:

- Soggetti maschi di età superiore a 45 anni con nessuna deviazione clinicamente significativa dal normale nell'anamnesi, nell'esame fisico, e nei test di laboratorio;
- Anamnesi di IPB per almeno 1 anno;
- IPB trattata farmacologicamente ma non controllata;
- Punteggio IPSS ≥ 8 e ≤ 19 (sintomatologia moderata).
- Volume prostatico ≥ 25 cc e ≤ 70 cc;
- Volume residuo post-minzionale (RPM) compreso tra 30 mL e 200 mL.
- PSA ≤ 4 ng/ml

CRITERI DI ESCLUSIONE

Saranno esclusi dallo studio i soggetti che presentano le seguenti caratteristiche:

- Anamnesi o evidenza da esame fisico, test clinici di laboratorio, di una malattia acuta o cronica che potesse interferire con lo studio o mettere in pericolo il soggetto;

- Uso di uno qualsiasi dei seguenti farmaci concomitanti: immunosoppressori, anticoagulanti, α -bloccanti, inibitori della 5 α -riduttasi, antipsicotici, chemioterapia, farmaci prescritti per la demenza, terapia di sostituzione ormonale maschile e farmaci prescritti per la vescica iperattiva;
- Vescica atonica e/o neurogena;
- Contrattura del collo vescicale;
- Prostatite acuta;
- Calcolosi vescicale;
- Documentata infezione del tratto urinario più di una volta negli ultimi 12 mesi;
- Cancro della prostata o della vescica;
- Anamnesi di traumi pelvici o interventi chirurgici;
- Insufficienza renale o epatica clinicamente significativa;
- Ematuria microscopica che non fosse stata valutata da un urologo e non fosse attribuita a IPB;
- Qualsiasi condizione che potesse interferire con la capacità del soggetto di fornire consenso informato, rispettare le istruzioni di studio, di fornire una valutazione oggettiva dei suoi sintomi o che potesse confondere l'interpretazione dei risultati dello studio.
- Tutti i soggetti che secondo i medici non siano idonei a partecipare allo studio in oggetto.

METODI

I soggetti reclutati dal Dott. Giuseppe Buonomo, Medico di Medicina Generale di Benevento, operante sul territorio dell'ASL di BENEVENTO, assumeranno durante lo studio una capsula gastroresistente al giorno dell'integratore alimentare a base di *Epilobium angustifolium* L, formulato da EPO Srl.

Ogni capsula gastro-resistente contiene:

- estratto secco (0,5 g) di *E. angustifolium*.

I soggetti saranno arruolati nello studio impiegando i criteri di inclusione ed esclusione sopra riportati.

Prima di essere inseriti nello studio, ai soggetti consenzienti, sarà consegnato:

- 1) il foglio informativo, allegato alla presente documentazione, con chiare informazioni riguardanti lo studio clinico, gli obiettivi e le modalità di realizzazione;
- 2) il consenso informato, allegato alla presente documentazione, che verrà compilato con i dati dei soggetti, da essi firmato e controfirmato dallo sperimentatore.

A conferma della diagnosi di IPB sarà valutata la gravità dei sintomi mediante una scala sintomatica validata, quale l'**International Prostatic Symptoms Score (IPSS)**; e secondo lo schema 1 saranno effettuate analisi specifiche:

t0 →	Volume e peso della prostata, volume urinario residuo, PSA totale, esame emocromocitometrico, Clearance creatinina, Bilirubina totale e frazionata, PT – AST – ALT - CHE
t1 (15giorni) →	Clearance creatinina, Bilirubina totale e frazionata, PT - AST – ALT - CHE
t2 (2 mesi) →	PSA totale, esame emocromocitometrico, Clearance creatinina, Bilirubina totale e frazionata, PT – AST – ALT - CHE
t3 (5 mesi) →	Volume e peso della prostata, volume urinario residuo, PSA totale, esame emocromocitometrico, Clearance creatinina, Bilirubina totale e frazionata, PT-AST-ALT –CHE

Schema 1.

I pazienti, selezionati sulla base dei criteri di inclusione e di esclusione, verranno divisi in due gruppi di studio, in base a una tabella di randomizzazione, e destinati a ricevere uno dei due differenti trattamenti a confronto (Epilobio e placebo).

Oltre alle visite prestabilite con la cadenza riportata nello schema 1, alla compilazione del questionario ogni 15 giorni dal reclutamento, saranno effettuate sei interviste telefoniche standardizzate con cadenza mensile per tutto il periodo dello studio, con la finalità di verificare la compliance e migliorare l'aderenza al protocollo. In particolare, durante queste telefonate sarà ricordato ai partecipanti di compilare ogni 15 giorni il questionario IPSS.

RISCHI E BENEFICI

I soggetti saranno continuamente monitorati, e saranno sottoposti ai seguenti esami ematici (come riportato nello schema 1) per escludere un'eventuale tossicità a livello epatico e renale:

- Clearance creatinina;
- Bilirubina totale e frazionata;
- Valutazione dei livelli di Alanina Amminotrasferasi (ALT), Aspartato Amminotrasferasi (AST), Tempo di protrombina (PT) e Colinesterasi (CHE).

Nel caso si verificassero effetti indesiderati durante lo studio, il soggetto sospenderà l'assunzione dell'integratore alimentare e lo stesso dovrà uscire dallo studio.

Si ipotizza, invece, un miglioramento dei sintomi del tratto urinario inferiore correlati a ipertrofia prostatica benigna.

EVENTI AVVERSI

Pur non essendo previsto nessun evento avverso legato all'assunzione dell'integratore alimentare, sarà annotato l'eventuale uso di farmaci durante il periodo di permanenza nello studio del soggetto e gli eventuali effetti avversi manifestati.

OUTCOME PRIMARI E SECONDARI

Outcome primario:

Valutazione della capacità dell'estratto di *Epilobium angustifolium* L. di ridurre il residuo vescicale post-minzionale e il volume (e peso) della prostata mediante ecografia prostatica.

Outcome secondari:

- Dosaggio del PSA;
- Rapporto neutrofili/linfociti;
- Valutazione della riduzione della sintomatologia mediante una scala sintomatica validata, quale la *International Prostate Symptom Score* (IPSS).

INFORMAZIONE AL PAZIENTE E CONSENSO INFORMATO

I soggetti, prima di essere arruolati nello studio clinico, verranno informati circa le finalità del progetto. L'informazione al paziente verrà fornita con apposito modulo in forma comprensibile per poter esprimere un consenso informato scritto e firmato. Lo sperimentatore, controfirmato il modulo stesso, dovrà dare una copia del consenso informato al soggetto e conservare l'originale. Il foglio di informazione per il soggetto e il modulo di consenso verranno valutati e approvati dal Comitato Etico durante l'esame del protocollo di studio.

CONSENSO INFORMATO

A ogni soggetto arruolato sarà sottoposto un consenso informato scritto preceduto da una chiara descrizione dell'obiettivo dello studio.

Il soggetto compilerà con i propri dati e firmerà il modulo del consenso, che verrà controfirmato dallo sperimentatore.

Come previsto dal Regolamento (UE) 2016/679.

PROTEZIONE DEI PAZIENTI ARRUOLATI

Lo sperimentatore principale si assicurerà che la ricerca sia condotta secondo il protocollo seguendo le procedure e le istruzioni fin qui descritte.

Lo sperimentatore principale coordinerà gli aspetti clinici e verificherà che lo studio clinico sia condotto secondo le Norme di Buona Pratica Clinica della Unione Europea (Direttiva 2001/20/EEC) in conformità con corrente Dichiarazione di Helsinki concernente la ricerca medica sugli umani (Helsinki 1964, modificata da: Tokyo 1975, Venezia 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1996 ed Edinburgo).

SPERIMENTATORE PRINCIPALE

Dott. Giuseppe Buonomo
Indirizzo: Via Martorano 82019 Sant'Agata de' Goti (BN)
Tel: +39 3331116150
Mail: giuseppebuonomo@tin.it

CENTRI PARTECIPANTI

Studio medico del Dott. Giuseppe Buonomo, operante sul territorio dell'ASL di BENEVENTO.

RISERVATEZZA DEI DATI

I dati clinici saranno trattati secondo le disposizioni vigenti in materia di *privacy* e i dati clinici dei singoli pazienti saranno trattati anonimamente. I dati dello studio immessi in computer saranno conservati osservando le leggi vigenti sulla *privacy* come previsto dal Regolamento (UE) 2016/679. Gli sperimentatori conserveranno una lista dei pazienti in modo che sia possibile la loro identificazione (D.L. 52/2008). I dati clinici saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche e relazioni congressuali.

La elaborazione dei dati avverrà presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università di Napoli Federico II e, in particolare, il data-base sarà affidato a un biometrista che provvederà alla produzione di un report statistico con i dati ottenuti dallo studio clinico.

PROTOCOL

TITLE

Double-blind, randomized, parallel-group, monocentric, placebo-blind clinical trial of the effect of an extract of *Epilobium angustifolium* L. with high oenothelin B content on benign prostatic hypertrophy (BPH).

The undersigned, as shown below, confirms that this study will be carry out in according to following protocol.

Surname and name	Address	Phone
Dr. Giuseppe Buonomo	Via Manzoni, 19 San Giorgio del Sannio 82100 Benevento, Italy	+39 3331116150

Summary

INTRODUCTION.....	17
BACKGROUND	17
STUDY OBJECTIVE.....	17
PRIMARY AND SECONDARY OUTCOMES	18
STUDY DESIGN.....	18
POPULATION AND NUMBER OF SAMPLES	19
BLINDING	20
DURATION OF STUDY	20
INCLUSION CRITERIA	21
EXCLUSION CRITERIA.....	21
METHODS	22
RISKS AND BENEFIT	23
PRINCIPAL INVESTIGATOR	24
PARTICIPATING CENTERS	25

INTRODUCTION

Epilobium angustifolium L. (also known as Epilobium) is an erect stem herbaceous plant belonging to the family Onagraceae, used in traditional Chinese medicine for the treatment of traumatic injuries, localized inflammation and disorders related to the menstrual cycle.

In the monograph on *E. angustifolium* published by the European Medicinal Agency (EMA), *E. angustifolium* resulted to be used in traditional medicine in over 30 different European Union countries, meeting the requirements for "traditional use" for the following indications: symptomatic treatment of mild urination disorders associated with BHP and irritable bladder (EMA/HMPC/712510/2014).

BACKGROUND

The American Urological Association (AUA) Guideline has defined benign prostatic hyperplasia (BPH) as a histologic diagnosis that refers to the proliferation of smooth muscle and epithelial cells within the prostatic transition zone, often occurring in the second growth phase.

The most common complication of BPH that requires hospitalization is acute urinary retention (AUR), which greatly affects subjects' quality of life and is an important health issue. Many of the other complications of BPH are in part due to complications of chronic urinary retention (CUR). These complications include recurrent urinary tract infections (UTIs), formation of bladder calculi, hematuria, and damage to bladder wall and kidneys.

The main pharmacological BPH treatments are α -blockers and 5 α -reductase inhibitors, such as tamsulosin and finasteride, respectively. Although the adverse effects of these drugs, do not occur frequently, particularly due to their non-selective action, can significantly affect sexual function, leading to erectile dysfunction.

Considering that prostatic inflammation plays an important role in BPH, *E. angustifolium* extracts are used in traditional medicine for the correct prostate function, and recent evidence suggests that *E. angustifolium* extracts exerts anti-inflammatory activity ascribed to oenothien B, the aim of this monocentric, randomised double-blind placebo-controlled clinical trial was to evaluate if a daily intake of a food supplement based on *E. angustifolium* extract with high oenothien B content, for a period of at least 5 months may allow a significant improvement in symptoms, and the improvement of urinary flow in subjects with mild/moderate BPH.

STUDY OBJECTIVE

The clinical study purpose is to evaluate if a daily intake of a food supplement based on *E. angustifolium* extract with high oenothien B content, for a period of 6 months may allow a significant improvement in symptoms, and the improvement of urinary flow in subjects with mild/moderate

BPH.

PRIMARY AND SECONDARY OUTCOMES

Primary Outcome:

The primary endpoint was to investigate the efficacy of a 6 months-daily dose of *E. angustifolium* extract to reduce PVR and prostate volume (and weight) in subjects with mild/moderate BPH, assessed at baseline (t0) and after 6 months (t3). A BPH diagnosis was made by the physician based on prostatic ultrasound, PSA assay and IPSS score.

Secondary Outcome:

As a secondary outcome, assessment of symptomatology reduction using a validated symptomatology scale, such as IPSS score; number of urinations during the night before each clinical visit; N/L ratio; and PSA assay were evaluated (t0, t2, t3).

STUDY DESIGN

Monocentric, randomized, double blind, parallel group, placebo controlled studies will be performed as reported in figure 1.

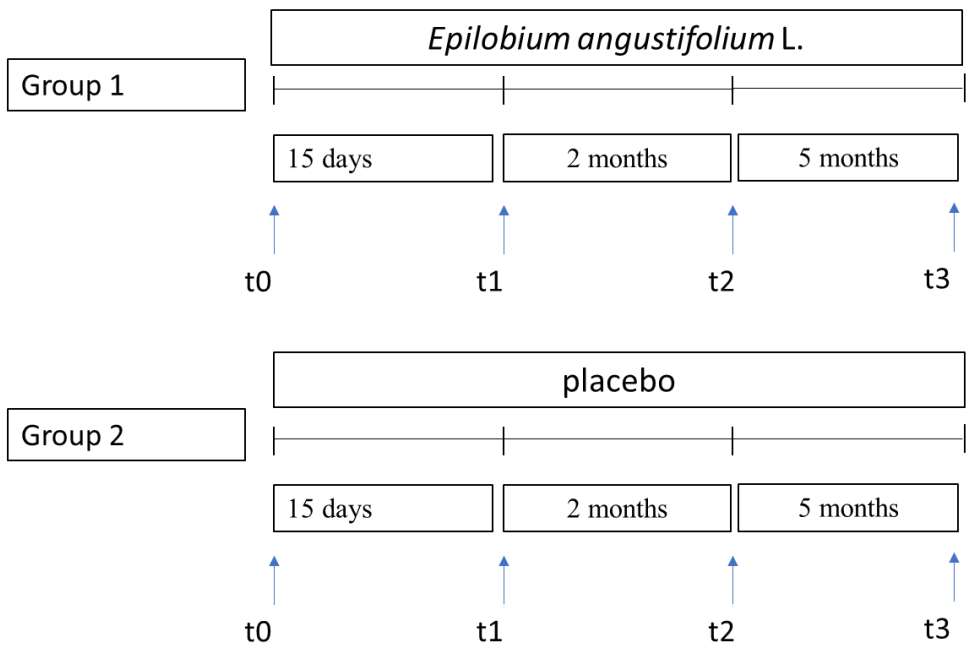


Figura 1. Study design

POPULATION AND NUMBER OF SAMPLES

In the study 130 male will be enrolled:

- 1) male over 45,
- 2) affected by mild/moderate BPH.

Participants are randomly allocated into two experimental groups: placebo and Epilobium. All recruited subjects took one hard gastro-resistant capsule per day containing 0.5 g of ENOTprost[®], corresponding to 2 g of aerial parts of *E. angustifolium*, or placebo, for 6 months. This dose was calculated taking into account the extraction yield (about 25%), and the indications of the Assessment report on *E. angustifolium* L. and/or *Epilobium parviflorum* Schreb., herba (European Medicines Agency, 2016. 24 November 2015 EMA/HMPC/712510/2014 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)).

Sample sizes

The sample size calculation was made using three 1- β power values equal to 0.95 and a significance level $\alpha = 0.05$. The sample size was determined to be 134 participants, allowing for a 15 % drop out rate.

Ecovol (Prostate volume) and post-void residual volume (PVR or Ecormp)

Effect size	r	(1- β)= 0.99 $\alpha = 0.05$	(1- β)= 0.95 $\alpha = 0.05$	(1- β)= 0.80 $\alpha = 0.05$
Large (0.40)	0	60	44	28
	0.5	30	24	16
Medium (0.25)	0	150	106	66
	0.5	75	54	34
Small (0.10)	0	922	650	396
	0.5	462	328	200

IPSS score

Effect size	R	(1- β)= 0.99 $\alpha = 0.05$	(1- β)= 0.95 $\alpha = 0.05$	(1- β)= 0.80 $\alpha = 0.05$
Da Coulson et al. 2013 (0.62)	0	28	20	14
	0.5	16	12	8

Modificato da Coulson et al. 2013	0	98	70	44
(0.31)	0.5	50	36	24

Statistical analysis

The effect of the treatment with this food supplement on the response variables for the primary outcome of the study (i.e. Ecovol, Ecomrp, urinations during night, and IPCC score) is assessed by generalized linear mixed models (GLMM) including treatment (Epilobium vs Control), measure (T0 vs T3), and age of the subject (standardized) as explanatory variables. We also add the treatment $\times$ measure interaction to account for differential effects of the treatment between T0 and T3. The subject enters the model as random intercept to account for unexplained variation at individual level (σ^2_{ind}) after we control for the explanatory variables. We perform an independent model for each response variable. Biochemical variables are analysed using a GLMM with the same predictors as for the four main response variables. Analyses are performed using the package lme4 (Bates et al. 2015) and MuMIn (Barton 2016) in R ver. 3.2.4 (R core Team 2016), and otherwise stated, data reported are means $\pm$ standard errors.

BLINDING

The study will be double-blind as neither the investigating physician nor the enlisted subject will know which Epilobium supplement and which placebo.

The two treatments will be made unrecognizable, in fact the packaging will be identical, and the treatments will be the same in color and taste.

DURATION OF STUDY

The clinical trial will be submitted to the local Ethics Committee for approval. The beginning of study is possible after approval of Ethics Committee and it will be closed after the enrollment of all patients and the conclusion of all analysis.

The subjects involved, at any time, can withdraw from the study without providing a motivation.

The subjects enrolled in study will be excluded if the following cases occur:

- subjects withdrawal their consent
- when a clinically relevant exclusion criterion occurs, which may influence the health of the subject;

- non-compliance of the subject with the protocol;
- decision of the principal investigator;

If the subject is not relevant to the indications of the study, the investigator will determine the reasons and circumstances accurately and completely.

INCLUSION CRITERIA

The inclusion criteria will be:

Male subjects over 45 should have the following characteristics:

- no clinically significant deviation in laboratory tests;
- History of BPH for at least 1 year;
- Pharmacologically treated but not controlled BPH;
- IPSS score ≥ 8 and ≤ 19 (moderate symptoms)
- Prostate volume $\geq 25\text{cc}$ and $\leq 70\text{cc}$;
- PVR between 30 mL and 200 mL;
- PSA $\leq 4\text{ng/ml}$

EXCLUSION CRITERIA

Subjects with the following criteria were excluded from the study:

- Acute or chronic disease that could interfere with the study or dangerous for the subject;
- Use of any of the following concomitant drugs: immunosuppressants, anticoagulants, α -blockers, 5 α -reductase inhibitors, antipsychotics, chemotherapy drugs, drugs for dementia, male hormone replacement therapy and drugs for overactive bladder, atonic and/or neurogenic bladder; bladder neck contracture;
- Acute prostatitis;
- Bladder calculosis;
- Urinary tract infection more than once in the last 12 months;
- Prostate or bladder cancer;
- History of pelvic trauma or surgery;
- Clinically significant kidney or hepatic insufficiency;
- Microscopic hematuria that was not evaluated by a urologist and not attributed to BPH;
- Any condition that might interfere with the subject's ability to give informed consent, to comply with study instructions, to provide an objective evaluation of his or her symptoms, or that might confuse the interpretation of study results;
- Those considered unsuitable for the participation by the physician.

METHODS

Subjects enrolled by Dott. Giuseppe Buonomo, operating in BENEVENTO ASL area, will take one hard gastro-resistant capsule per day containing 0.5 g of *E. angustifolium*, corresponding to 2 g of aerial parts of *E. angustifolium*, or placebo, for at least 5 months.

Subjects will be enrolled for the study following inclusion and exclusion criteria, previously described.

Before being included in the study, the consenting subjects will be delivered:

- 1) information sheet, with clear information regarding the clinical study, objectives and methods of implementation;
- 2) informed consent, which will be filled in with the subjects' data, signed by them and countersigned by the investigator.

BPH diagnosis was made by the physician based on prostatic ultrasound, PSA assay and IPSS score. Clinical visits are carried out at t1 (after 15 days of treatment) to monitor a possible occurrence of kidney and liver toxicity, t2 (after 2 months of treatment), and t3 (after 5 months of treatment) in an outpatient setting. After each clinical visit, all data are compiled in the CRF by physicians. At the baseline visit (t0) information on the sociodemographic, clinical and symptomatologic characteristics of the subjects are collected and reported in the case report form (CRF). In particular, post-void residual (PVR) and prostate volume (and weight) obtained by prostate ultrasound; PSA, neutrophil/lymphocyte ratio (N/L) derived from blood tests analysed by Unisannio Lab (San Giorgio del Sannio, BN, Italy); urinations number during the night before the clinical visit, and IPSS score are registered.

In detail, the specific analyses are shown below:

t0 →	Ecovol, PVR (Ecomp), PSA, N/L, CRE, BR direct/indirect/total, Prothrombin, AST, ALT, CHE
t1 (15 days) →	CRE, BR direct/indirect/total, Prothrombin, AST, ALT, CHE
t2 (2 months) →	PSA, N/R, CRE, BR direct/indirect/total, Prothrombin, AST, ALT, CHE
t3 (5 months) →	Ecovol, PVR (Ecomp), PSA, N/R, CRE, BR direct/indirect/total, Prothrombin, AST, ALT, CHE

Abbreviations: Ecovol (Prostate volume), post-void residual volume (PVR or Ecomp), neutrophil/lymphocyte ratio (N/L), creatinine (CRE), bilirubin (BR direct/indirect/total), prothrombin, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), cholinesterase (CHE).

RANDOMISATION

The randomization sequence will be generated by a statistician using STATA 16 software (Stata Statistical Software: Release 16. College Station, TX: StataCorp LLC), and subjects (compliant to the inclusion and exclusion criteria) will be assigned to each of the two treatment groups (Epilobium and placebo) randomly and unpredictably by simple randomization (1:1 allocation ratio). The randomization code will consist of a three-digit number as indicated in the respective Case Report Form (CRF).

DATA COLLECTION

The data collection will be carried out through the appropriate forms (Case Reporting Form - CRF) divided into two main sections. A first section will be related to personal data, the patient's medical history, the intake of any concomitant drugs, and the treatment group (Epilobium-or placebo) and must be completed at the enrolment. Instead, the second section should be completed at the control visit.

RISKS AND BENEFIT

There are no known risks to participants taking part in this study, considering the traditional use of Epilobium for urinary tract health. Participants taking part in this study should have a benefit on the urinary tract.

In the clinical trial hepatic and renal toxicity tests have been studied. In particular, blood tests to evaluate creatinine (CRE), bilirubin (BR direct/indirect/total), prothrombin, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), and cholinesterase (CHE) were performed at t0, t1, t2, t3.

For the evaluation of tolerance and safety of the intervention (*E. angustifolium* food supplement capsules), adverse events were monitored throughout the intervention period through spontaneous reporting of adverse events (AEs) by the participants to the relative physicians. At the end of the intervention period all subject data were evaluated by the principal investigator to determine the presence or absence of AEs.

ADVERSE EVENTS

Any possible use of the subject's medication and any adverse effects manifested will be noted.

The doctor will note on the CRF remote and near pathologies, and the result of the oral throat swab carried out.

INFORMATION TO THE PATIENT AND INFORMED CONSENT

The subjects, before being enrolled in the clinical study, will be informed about the aims of the project. The information to the patient will be provided with an appropriate form in a comprehensible form in order to express an informed written and signed consent. The investigator, countersigned the form itself, should give a copy of the informed consent to the subject and keep the original. The subject information sheet and consent form will be evaluated and approved by the Ethics Committee during the examination of the study protocol. Each person enrolled will be given informed written consent preceded by a clear description of the purpose of the study. The subject will fill in their data and sign the consent form, which will be countersigned by the investigator. Informed consent will be signed in accordance with Regulation (EU) 2016/679.

ETHICAL ASPECTS AND PROTECTION OF PATIENTS ENROLLED

The principal investigator shall ensure that the research is conducted according to the protocol following the procedures and instructions described above. The principal investigator will coordinate the clinical aspects and verify that the clinical trial is conducted in accordance with the European Union's Good Clinical Practice Standards (Directive 2001/20/EEC) in accordance with the current Helsinki Declaration on Human Medical Research (Helsinki 1964, as amended by: Tokyo 1975, Venice 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1996 and Edinburgh), and guidelines for good clinical practice (CPMP/ICH/ 135/95). In order to ensure compliance with the protocol, good clinical practice (GCP) and regulatory requirements, authorized personnel of the Department of Pharmacy will ensure continuous monitoring, both during and after the study.

PRINCIPAL INVESTIGATOR

Dott. Giuseppe Buonomo
Address: Via Manzoni, 19 San Giorgio del Sannio (BN) Italy 82100
Phone: +39 3331116150
e-mail: giuseppebuonomo@tin.it

PARTECIPATING CENTERS

UCCP (Center for primary care), medical office of Dott. Giuseppe Buonomo, operating in BENEVENTO ASL area.

CONFIDENTIALITY OF DATA

Clinical data will be processed in accordance with current privacy regulations and clinical data of individual patients will be processed anonymously. The study data entered into the computer will be stored in accordance with applicable privacy laws as provided in the Regulation (EU) 2016/679. The investigators will keep a list of patients so that they can be identified (D.L. 52/2008). The clinical data will be report in scientific publications and conference reports. The data processing will take place at the Department of Pharmacy of the University of Naples Federico II and the database will be entrusted to a biometrician who will produce a statistical report with the data obtained from the clinical study.

BIBLIOGRAFY

- Auffenberg G, Helfan B, McVary K: Established medical therapy for benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* 2009; 36: 443.
- Frohne D. *Epilobium parviflorum* u.a. kleinblütige Arten – Kleinblütiges Weidenröschen. In *Heilpflanzenlexikon*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2006, 211.
- Granica S, Piwowarski JP, Czerwinska ME, Kiss AK. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review. *J Ethnopharmacol* 2014, 156:316-346
- Hiermann A, Juan H, Sametz W. Die phytochemische Untersuchung von *Epilobium*-Infusen und deren Einfluss auf die Prostaglandinsynthese. *Farmaceutisch Tijdschrift voor België* 1984, 61(3):282.
- Jakub P. Piwowarski, Barbara Bobrowska-Korczak, Iwona Stanisławska, Wojciech Bielecki, Robert Wrzesien, Sebastian Granica, Katarzyna Krupa, Anna K. Kiss. Evaluation of the Effect of *Epilobium angustifolium* Aqueous Extract on LNCaP Cell Proliferation in In Vitro and In Vivo Models. *Planta Med* 2017; 83(14/15): 1159-1168
- Jänicke C, Grünwald J, Brendler T. Weidenröschen – *Epilobium angustifolium*. In *Handbuch Phytotherapie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2003, 558-559.
- Lachinger M. Untersuchung von Inhaltsstoffen einheimischer *Epilobium*-Arten. Master Thesis, University of Vienna 2004.

- Lee C, Kozlowski J, Grayhack J: Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate* 1997; 31: 131.
- McVary K: BPH: Epidemiology and Comorbidities. *Am J Manag Care* 12 2006; 5 Suppl: S122.
- S. Wissenschaftliche Reflexionen über traditionelle Arzneimittel in Österreich. PhD Thesis, University of Vienna 2007.
- Saukel H. Pharmakobotanische Untersuchungen von Arzneidrogen II. *Herba Epilobii*. 1. Mitteilung. *Sci Pharm* 1982, 50:179-200.
- Saukel H. Pharmakobotanische Untersuchungen von Arzneidrogen II. *Herba Epilobii*. 1. Mitteilung. *Sci Pharm* 1982, 50:179-200.
- Schilcher H, Kammerer S, Wegener T. *Leitfaden Phytotherapie*. Elsevier GmbH, München 2010.
- Schilcher H. Bedeutung von Arzneipflanzen und Phytopharmaka in der Bundesrepublik Deutschland. *Pharmazeutische Zeitung* 1982, 127(41): 2174-2179.
- Schilcher H. Pflanzliche Urologika, *Dtsch Apoth Ztg* 1984, 124(47):2429-2436.
- Stolarczyk M, Piwowarski JP, Granica S, Stefańska J, Naruszewicz M, Kiss AK. Extracts from *Epilobium* sp. Herbs, Their Components and Gut Microbiota Metabolites of *Epilobium* Ellagitannins, Urolithins, Inhibit Hormone-Dependent Prostate Cancer Cells- (LNCaP) Proliferation and PSA Secretion. *Phytother. Res.* 2013; 27: 1842–1848.
- Van Wyk BE, Wink C, Wink M. *Epilobium parviflorum*. In *Handbuch der Arzneipflanzen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2004, 135.
- Wei J, Calhoun E, Jacobsen S: Urologic diseases in America project: benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2005; 173: 1256.
- Wichtl M, Tadros W. *Weidenröschen-Tee: Ein Beitrag zur Untersuchung*. *Dtsch Apoth Ztg* 1982, 122(50):2593-2598.
- Wichtl M. *Teedrogen und Phytopharmaka*. 5th ed. Wiss. VerlagsgesmbH, Stuttgart 2009.
- Wichtl M. *Teedrogen*. Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1984