

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901965776A1

Publication Date

20130121

Applicant

SALVINELLI FABRIZIO

Title

PRODOTTO PER STIMOLARE LA PRODUZIONE ENDOGENA DI MEDIATORI
DELL'INFIAMMAZIONE.

Prodotto per stimolare la produzione endogena di mediatori dell'inflammatione

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un prodotto comprendente un agente a osmolalità
5 minore, uguale o superiore fino al 30% a quella del sangue, per applicazione in tutta la
mucosa nasale per provocare una inflammatione di tipo irritativo per uso in un
trattamento di stimolazione della produzione endogena di mediatori dell'inflammatione
quali NGF, Neurotrofina 3 e Neurotrofina 4, Serotonina, Sostanza P, Eparina, Fattore
di chemiotassi degli eosinofili (*Eosinophil chemotactic factor*)(ECF-A), nella terapia e
10 prevenzione delle patologie del sistema nervoso negli esseri umani e/o animali.

Stato della tecnica

L'NGF fu scoperto negli anni 50 da Rita Levi Montalcini, che per circa trent'anni
proseguì le ricerche su questa molecola proteica e sul suo meccanismo d'azione, per
15 le quali nel 1986 è stata insignita del premio Nobel per la medicina insieme allo
statunitense Stanley Cohen. Nella motivazione del Premio si legge: «*La scoperta del
NGF all'inizio degli anni cinquanta è un esempio affascinante di come un osservatore
acuto possa estrarre ipotesi valide da un apparente caos*». In precedenza i
neurobiologi non avevano idea di quali processi intervenissero nella corretta
20 innervazione degli organi e tessuti dell'organismo». Il Nerve growth factor (NGF),
Fattore di crescita nervoso, è una proteina segnale coinvolta nello sviluppo del sistema
nervoso nei vertebrati. Indirizza e regola la crescita e la sopravvivenza dei neuroni,
tramite meccanismi di segnalazione cellulare. E' attiva nella protezione del sistema
nervoso. Il quadro più generale che emerge dall'analisi della letteratura recente
25 suggerisce che quando un neurone in via di sviluppo invia proiezioni ad un bersaglio
appropriato in cui sia espresso l'NGF si assiste ad un'attivazione di segnali che
mediano in senso positivo la sopravvivenza attraverso il recettore ad alta affinità trkA e
il p75NTR. Al contrario se le proiezioni raggiungono un bersaglio inappropriato, viene
prodotto BDNF e si innesca un processo di morte cellulare a seguito dell'attivazione
30 (attraverso una serie di vie intra- ed extracellulari tuttora da chiarire) del p75NTR (1).

(Si è visto che se i topi vengono privati dell'NGF hanno deficit della memoria simili a quelli provocati dall'Alzheimer. Il principale responsabile della malattia di Alzheimer è un peptide, chiamato beta-amiloide, la cui produzione nelle cellule normali è soppressa dal NGF. Se il NGF viene rimosso da una coltura di cellule nervose, si attiva in poco
5 tempo la produzione di questo peptide. Si è visto inoltre che NGF è capace di arrestare l'atrofizzazione dei neuroni che producono acetilcolina, la cui diminuzione è coinvolta nella sintomatologia del morbo di Alzheimer. (2). Un caso report pubblicato su Lancet (1999) ha evidenziato come l'utilizzo di NGF nella cura delle piaghe da decubito sia molto efficace (3). Pazienti con delle ulcere corneali neurotrofiche, ulcere
10 che si determinano per mancanza di innervazione, sono stati trattati con un collirio a base di NGF e si è ottenuta una riparazione totale della cornea. (4-7).

Si è visto che NGF in collirio non solo passa, attraverso la sclera, cioè la parte bianca dell'occhio, nella porzione posteriore, ma arriva addirittura a livello cerebrale, cioè ai nuclei di base e alle cellule retiniche che sono quelle che danno inizio al processo
15 visivo. Questo perché l'occhio è comunque una derivazione del sistema nervoso centrale. Quindi ricercatori hanno indotto artificialmente nei ratti il glaucoma, che è provocato principalmente da una ipertensione dell'occhio che grava sul nervo e lo necrotizza. In quelli trattati con NGF una parte notevole delle fibre nervose, più del 25%, era risparmiata dalla necrosi e il danno non si produceva. Attualmente la terapia
20 del glaucoma ha un solo obiettivo perseguibile: abbassare la pressione dell'occhio. Però ci sono casi in cui, nonostante con i farmaci attuali si ottenga una buona pressione oculare, il danno progredisce lo stesso. Sono i cosiddetti glaucomi "a bassa tensione". Si è somministrato NGF in collirio a tre pazienti con glaucoma a lunga durata e in progressivo peggioramento: in uno il glaucoma si è stabilizzato, negli altri
25 due c'è stato un campo visivo che, da quasi nero, ha cominciato ad avere ampie zone di vista. In questi pazienti NGF è utile perché non agisce sulla pressione ma ha un'azione rigeneratrice sul nervo ottico. Il risultato si è ottenuto dopo un trattamento di soli tre mesi. E quando il trattamento è stato sospeso per altri tre mesi il beneficio si è mantenuto. (8) Del resto, molti studi della Montalcini dimostrano che le cellule nervose
30 in vitro a contatto con l'NGF ricrescono. NGF è una proteina, che insieme ad altre

neuroproteine che stimolano lo sviluppo delle cellule nervose, potrebbe essere attiva anche sulla perdita dei capelli. Recenti studi hanno infatti individuato che anche sui follicoli piliferi sono presenti recettori simili a quelli neuronali, con cui le neuroproteine regolerebbero il ciclo vitale e di crescita dei capelli. Topi privati del NGF ed esposti a rumore subiscono un trauma uditivo ben maggiore di topi normali. NGF è liberato anche nella cute, non solo da fibre nervose ma anche da cheratinociti basali, mastcellule, cellule di merkel. I cheratinociti, cellule della cute, esprimono in particolare anche recettori per NGF sia ad alta che a bassa affinità'. Il NGF più' del' EGF (epidermal growth factor) stimola la proliferazione dei cheratinociti e previene l'apoptosi (suicidio cellulare) dei cheratinociti, favorendo l'espressione del bc12. I cheratinociti hanno una azione protettiva contro gli agenti esterni nocivi sulla cute, attivando l'arrivo di immunociti. Si ritiene pertanto che NGF possa avere un ruolo nella protezione di patologie cutanee quali eritema solare, dermatite atopica, linfoma cutaneo a cellule T, carcinoma spinocellulare, sclerodermia, lesioni iperproliferative paraneoplastiche, psoriasi. Diversi esperimenti hanno dimostrato che l'NGF possa essere usato, oltre che per prevenire i danni neuronali di origine chirurgica, chimica, meccanica o ischemica (cioè da interruzione della irrorazione sanguigna che provoca una mancanza di ossigenazione indispensabile per la vita delle cellule), anche per la cura di patologie del sistema nervoso centrale e periferico. (9). Ngf ha la proprietà di nutrire la cellula cerebrale e di preservarla dall'invecchiamento, anzi oltre a posticipare l'apoptosi della cellula, ne aumenta anche le dimensioni e le importanti ramificazioni che collegano tra loro i neuroni. Questa condizione dà vita al cosiddetto fenomeno della "plasticità neuronale".

Il mastocita, cellula implicata nella risposta immunitaria ed infiammatoria, ha al suo interno centinaia di vescicole che contengono svariate sostanze. Quando il mastocita è chiamato ad agire per fronteggiare un danno tissutale, ad esempio allergico, infiammatorio, da infezione o da trauma, queste vescicole degranulano, ossia rilasciano le loro sostanze e in questo modo proteggono e curano il tessuto circostante, favorendone la guarigione. Tra le sostanze liberate dai mastociti vi è il NGF. Ad esempio nella patologia oculare, quale la congiuntivite primaverile, una

patologia di natura allergica, si è visto che vi era un aumento dei livelli circolanti di NGF e come tali incrementi fossero correlati con l'entità dell'infiltrato mastocitario congiuntivale. Più in generale, la concentrazione di NGF è elevata in tutta una serie di condizioni infiammatorie ed autoimmuni compresa l'encefalomielite allergica sperimentale (EAE), il modello più ampiamente utilizzato per la sclerosi multipla, in
5 combinazione con un grande aumento di mastociti (Calzà et al., 1997). Anche su queste basi, è stato ampiamente studiato il possibile ruolo dell'NGF come modulatore della risposta immunitaria, portando a concludere che vi sia un aumento dell'NGF nelle condizioni infiammatorie (10).

10 Dato che è stato dimostrato che NGF ha un ruolo importante nel proteggere le cellule nervose, è utile ed importante somministrare NGF ai pazienti con patologie del tessuto nervoso. Ma è dimostrato che la strada per arrivare a mettere a punto un farmaco efficace è molto lunga. Occorre produrre una sufficiente quantità di NGF e ciò è tanto costoso da prevenire la realizzazione di questo farmaco pur essendo NGF stato
15 scoperto nel 1951.

Infatti, NGF che è stato utilizzato in genere nei lavori di ricerca precedenti è di estrazione animale, dalle ghiandole salivari del ratto ed ha altissimi costi di estrazione. Questi costi elevatissimi, impensabili per una terapia da diffondere, spiegano perché gli studi precedenti si basano su di un esiguo numero di pazienti. Si è ipotizzata la
20 soluzione di produrre in laboratorio un NGF sintetico, ma il passaggio dal prodotto di derivazione animale al sintetico è costosissimo e non è in corso.

Stone provò a stimolare la produzione di NGF "direttamente nel sistema nervoso centrale" somministrando a topi un agente chimico, che fosse almeno un β agonista o $\alpha 1$ -agonista e/o $\alpha 2$ antagonista per via orale o parenterale e ne ipotizzò l'uso anche
25 nasale. (11) Si trattava del tentativo di stimolare il sistema nervoso centrale con agenti chimici. Tuttavia l'arrivo di queste sostanze chimiche nel SNC presenta il concreto rischio di gravi complicazioni.

Lerner ipotizzò un metodo di trasportare un qualsivoglia medicinale al sistema nervoso centrale attraverso la zona olfattoria utilizzando l'applicazione di un potenziale
30 elettrico. Anche questa soluzione presentava lo svantaggio di mettere fortemente a

rischio l'area olfattoria, e provocare la perdita dell'olfatto, e la lamina cribrosa con rischio di meningite, per l'introduzione di un elettrodo nasale e per l'uso di un potenziale elettrico. (12)

Svantaggi analoghi sono presenti nella realizzazione di cui alla domanda di brevetto
5 USA di Di Mauro [Appl. No: 11/457,340] che ha utilizzato il metodo di somministrazione al Sistema nervoso centrale (SNC) di una qualsivoglia sostanza per via della lamina cribra proposto da Lerner, sostituendo il mezzo elettrico con un mezzo meccanico, e il metodo di Stone per utilizzare una sostanza chimica simile a quelle da Stone ipotizzate che giungesse a stimolare nel SNC la produzione di NGF. Di Mauro
10 ha infatti preparato un erogatore uguale a quelli in commercio e ha collegato un tubo da posizionare nel naso sotto la lamina cribra per poi spruzzare il clenbuterolo o sostanza β adrenergica equivalente direttamente nell'encefalo. Tuttavia questo modo di somministrazione è potenzialmente pericoloso poiché non considera che la lamina cribrosa (o cribra) che separa il cervello dal naso, ha una distanza dal vestibolo nasale
15 variabile da persona a persona ed anche il suo spessore osseo è variabile ed in molti casi sottilissimo, per cui si espone il paziente al rischio di una rottura della lamina cribra e ad una conseguente meningite, evento potenzialmente letale. Rischio che era già nella tecnica di Lerner, per l'introduzione di un elettrodo nella zona della lamina cribrosa. Altra possibilità di rottura della lamina è data dallo spruzzo che viene erogato
20 in estrema prossimità della lamina. Ulteriore grave controindicazione l'uso di clenbuterolo o sostanze analoghe beta adrenergiche. Si pensi che il clenbuterolo è sostanza proibita usata dagli allevatori disonesti per ingrassare con effetto anabolizzante gli animali che poi vengono sottoposti a forti diuretici nei venti giorni prima della macellazione per farne sparire le tracce ai controlli veterinari. Il vincitore del
25 tour de france del 2010 Alberto Contador è stato sospeso nel settembre 2010 dall'unione ciclistica internazionale (UCI) per minime tracce di clenbuterolo nelle urine (e' illegale anche una sola molecola). Pertanto, le soluzioni indicate rendevano improponibile la somministrazione anche di una sola dose di clenbuterolo attraverso la lamina e men che mai una somministrazione ripetuta. Questo rischio era già nella

tecnica di Stone che brevettava l'uso di sostanze quali il clenbuterolo o sostanze analoghe. (11-13).

In un'altra richiesta di brevetto Di Mauro (14) presentava uno strumento per facilitare il passaggio di sostanze medicinali attraverso la lamina cribra o le meningi, basato in
5 analogia a Lerner sulla creazione di una differenza di potenziale. Anche questa soluzione sommava i pericoli dovuti all'elettricità, presenti nel lavoro di Lerner, con i pericoli per la lamina cribra dell'introduzione traumatica di uno strumento, presenti nel precedente lavoro di Di Mauro (Appl. No: 11/200,438).

Le realizzazioni dello stato della tecnica presentavano quindi vari svantaggi quali ad
10 esempio quelli di esporre il paziente ai rischi collegati:

- a. all'utilizzo di agenti chimici irritanti per produrre NGF quali alfa1 o alfa2 somministrati per via orale o parenterale,
- b. all'utilizzo di stimoli elettrici nel naso e nel cranio,
- c. alla somministrazione di sostanze chimiche attraverso la lamina cribra per agire
15 direttamente nel cervello con i suoi potenziali effetti devastanti
- d. alla somministrazione di Beta adrenergici da mandare nel cervello con le gravissime controindicazioni riportate.

Infatti nella realtà nessuno ha usato questi metodi in terapia sull'uomo e comunque nessuno nell'uso prolungato.

20 Era pertanto presente nello stato della tecnica il bisogno di trovare soluzioni che non presentassero i precedenti svantaggi.

Conoscenze generali sull'infiammazione

L'Infiammazione è una risposta ad un danno tissutale che ha lo scopo di isolare la zona danneggiata dagli agenti lesivi ed impedire loro di diffondere nell'organismo, di
25 richiamare nella zona cellule ad azione antiinfettiva ed in finale di stimolare la guarigione. Si vedano ad esempio i problemi che hanno persone con difetti congeniti nei componenti del processo infiammatorio: esempio 1: un difetto nel produrre i fattori del complemento (C5-C6-C7-C8-C9) aumenta il rischio infettivo; esempio 2: un deficit nella produzione di specie di ossigeno reattivo (ROS) porta alla malattia
30 granulomatosa cronica. Appaiono giocare un ruolo *anche le Mastcellule* (sinonimo:

Mastociti) che, a fronte di uno stimolo infiammatorio, rivestono un ruolo chiave nell'iniziare l'infiammazione, con azione di sostanze già immagazzinate nei granuli citoplasmatici e rilasciate immediatamente, o con azione di sostanze di nuova sintesi o con sostanze che agiscono richiamando (chemiotassi) nella zona infiammatoria i globuli bianchi che hanno azione difensiva sulle infezioni e che producono essi stessi mediatori dell'infiammazione tra i quali possiamo citare:

-Mediatori preformati, rilasciati dai granuli dei Mastociti nello spazio extracellulare:

NGF, Neurotrofina 3 e Neurotrofina 4, Triptasi, Istamina. Eparina e altri proteoglicani, Serotonina,

10 -Mediatori lipidici (eicosanoidi) che si formano successivamente, per il coinvolgimento di altre cellule dell'infiammazione:

Prostaglandine D2, Leucotrieni, C4, Fattore di attivazione piastrinica (Platelet activating factor) (PAF)

15 -Mediatori, prodotti dalle mastcellule o dalle altre cellule coinvolte nell'infiammazione, attivi nel richiamare nella zona infiammatoria i globuli bianchi ad azione difensiva sulle infezioni: (neutrofili, monociti, cellule dendritiche che presentano l'antigene, tutti i linfociti quali le cellule B e le cellule T attive nella risposta immune, le cellule ad azione natural killer (NK) ad azione antitumorale e gli eosinofili). Citochine: Fattore di chemiotassi degli eosinofili.(Eosinophil chemotactic factor)(ECF-A).

20 -Le altre cellule che intervengono nel meccanismo infiammatorio producono sostanze: Sostanza P, TNF-alpha, Triptasi, Chemochine, Istamina, Specie di ossigeno reattivo (ROS), Interleuchina 1 (IL-1), Inflammasomi, Bradichinina, Prostaglandine e Leucotrieni.

Descrizione del ruolo svolto dai mediatori dell'infiammazione

25 **NGF.** Prodotto dalle mast cellule e liberato dai loro granuli, ma anche prodotto dagli eosinofili e dai macrofagi, tutte cellule che intervengono nel processo infiammatorio, viene descritto da pag. 1 (15-16).

NEUROTROFINA 3 e NEUROTROFINA 4. Liberate dai granuli delle mast cellule, hanno azione protettiva sulle cellule del sistema nervoso.

SEROTONINA(5-HT). Nota anche come ormone del buonumore, è una triptamina, neurotrasmettitore monoaminico sintetizzato nei neuroni serotoninergici del sistema nervoso centrale e nelle cellule enterocromaffini dell'apparato gastrointestinale a partire dall'aminoacido essenziale Triptofano. I recettori per la serotonina si trovano
5 principalmente sulla membrana cellulare delle cellule nervose nel sistema nervoso centrale e periferico dove la serotonina esplica la sua azione. Ha un ruolo importante nel controllo dell'appetito e del comportamento alimentare, sull'emicrania, sulla pressione sanguigna, sulla eiaculazione precoce e sul sonno.

Controllo dell'appetito e del comportamento alimentare. Accelera la comparsa del
10 senso di sazietà e in generale la riduzione del cibo ingerito. Per questo alcuni farmaci anoressizzanti quali la fenfluramina, agiscono aumentando il segnale della serotonina. La Serotonina (S) stimola anche la riduzione dell'assunzione dei carboidrati per un feed back negativo. L'ingestione di carboidrati stimola la produzione di insulina che facilita l'ingresso dei nutrienti nelle cellule, ivi compresi gli aminoacidi ad eccezione del
15 triptofano, che quindi aumenta i suoi livelli relativi di concentrazione nel sangue. L'aumento relativo del triptofano agevola il suo passaggio nel sistema nervoso centrale dove stimola la produzione di serotonina.

La Serotonina ha un effetto euforizzante. Ecco perché i soggetti golosi, che mangiano molti dolci (ricchi di carboidrati semplici) che porta come si è detto alla produzione di
20 serotonina, hanno in genere un umore migliore degli altri. Molte persone che si trovano in periodo di stress e che presentano un calo dell'umore e le molte donne che presentano una depressione pre mestruale avvertono un bisogno di assumere dolci ma anche cioccolato, che contiene serotonina e ne favorisce la produzione, perché ricco di zuccheri semplici. Un basso livello di serotonina nel sistema nervoso centrale
25 (SNC) provoca depressione, stato di ansietà ma anche aggressività. Una persona con bassi livelli di serotonina può essere incline a consumare maggiori quantità di zucchero nel tentativo di aumentare la produzione di Serotonina e ciò può portare al diabete.

La Serotonina ha un effetto calmante. A livello del SNC la S viene rilasciata dal terminale assonico presinaptico, una parte agisce sul recettore postsinaptico, mentre
30 la parte eccedente viene riassorbita dal terminale presinaptico e immagazzinata in

vescicole oppure degradata dalle monoaminoossidasi (MAO). I farmaci MAO inibitori agiscono bloccando le monoaminoossidasi e provocano così nel sistema nervoso centrale (SNC) un aumento di serotonina e delle altre monoamine cerebrali. Psicofarmaci molto diffusi come gli antidepressivi SSRI (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors – Inibitori Selettivi della Ricaptazione della Serotonina) (es Prozac™, Dropaxin™, Zoloft™) gli antidepressivi triciclici e gli inibitori delle MAO agiscono su questo neurotrasmettitore.

Ruolo sull'emicrania. Alcuni farmaci con proprietà antiemicraniche sono agonisti dei recettori per la serotonina e così aumentano il segnale della serotonina (es: sumatriptan: Imitrex™, Imigran™ Imigran recovery™).

Controllo della pressione sanguigna- La S agisce sulla contrazione delle arterie, agendo nel controllo della pressione sanguigna.

Controllo della eiaculazione precoce. La serotonina rappresenta il freno naturale del riflesso dell'eiaculazione. Un basso livello di 5H è la causa biologica principale dell'eiaculazione precoce.

Sonno. La giusta quantità di serotonina riduce lo stress e concilia e regola il ciclo del sonno. Ricercatori hanno sperimentato sulla drosophila melanogaster ed hanno dimostrato che il trattamento farmacologico con serotonina aumenta la quantità e la qualità del sonno. (17-18)

SOSTANZA P (SP). Prodotta e rilasciata da eosinofili, macrofagi, cellule endoteliali, terminazioni nervose. Un ruolo importante nello stimolo alla sintesi di SP è rivestito dalle mast cellule che a seguito di stimoli irritativi agiscono da trigger dell'infiammazione con la liberazione di mediatori dell'infiammazione endocellulari ed il richiamo nella zona infiammata di eosinofili e macrofagi. Le mast cellule liberano NGF che aumenta la produzione da parte delle terminazioni nervose di Calcitonine Gene-Related Peptide (CGRP) e di sostanza P che sono efficaci nella riduzione della pressione sanguigna (19). La SP induce la produzione di fattori di crescita ematopoietica (HGF) dai monociti umani ed è un potente stimolatore dell'ematopoiesi per i progenitori della serie eritroide e granulocitica (20). La SP modula il dolore e in alte concentrazione previene o riduce la cefalea (21-22-23-24-25).

EPARINA ED ALTRI PROTEOGLICANI. Liberata dai granuli delle mast cellule, ha azione anticoagulante. Viene utilizzata come fluidificante del sangue, in specie nei pazienti che hanno una maggiore coagulabilità del sangue o con fattori di rischio quali fibrillazione atriale, trombosi venosa profonda, soggetti in dialisi, per prevenire la
5 formazione di trombi ed il rischio di complicanze anche mortali quali la trombosi polmonare o l'infarto cardiaco. Può avere un ruolo nella prevenzione della formazione di trombi in pazienti operati di chirurgia cardiaca o per posizionamento di stent coronarici. (26)

FATTORE DI CHEMIOTASSI DEGLI EOSINOFILI (eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis) (ECF-A). Prodotto principalmente dalle mast cellule, richiama gli
10 eosinofili nella zona dell'infiammazione. Gli eosinofili sono attivi nella difesa antibatterica e antivirale e agiscono facilitando l'azione della immunità cellulare (27-28).

Altri mediatori dell'infiammazione, tutti utili nella reazione antiinfiammatoria e immune,
15 sono Triptasi, Istamina, Prostaglandine (29), Leucotrieni, Fattore di aggregazione piastrinica (PAF)(30), TNF alpha, Chemochine, Specie di ossigeno reattivo (RAS), Interleuchina 1 (IL-1), Inflammasomi, Bradichinina (31-32-33-34-35).

E' stato ora sorprendentemente trovato che attraverso la stimolazione di una reazione infiammatoria nella mucosa naso paranasale è possibile produrre NGF endogeno e di
20 altri mediatori dell'infiammazione. Inoltre, è stato anche sorprendentemente trovato dagli inventori della presente invenzione che è possibile stimolare anche la produzione di tutti i mediatori dell'infiammazione (inflammatory mediators (abbreviati qui anche in IM): Neurotrofina 3 e Neurotrofina 4, Serotonina, Sostanza P, Eparina, Fattore di chemiotassi degli eosinofili.(Eosinophil chemotactic factor)(ECF-A), Triptasi, Istamina,
25 Prostaglandine (29), Leucotrieni, Fattore di aggregazione piastrinica (PAF)(30), TNF alpha, Chemochine, Specie di ossigeno reattivo (RAS), Interleuchina 1 (IL-1), Inflammasomi, Bradichinina, riuscendo ad ottenerne una quantità sufficiente per i trattamenti terapeutici indicati senza dover ricorrere ad estrazioni costose o a complicati processi di sintesi ma solo imitando ciò che avviene nella normale reazione
30 infiammatoria.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione il prodotto oggetto della rivendicazione 1 e seguenti.

Breve descrizione delle figure:

Alla presente descrizione sono allegate 11 figure che mostrano:

5 Fig. 1 Livelli sierici medi di NGF pre trattamento espressi in pg/ml (n.236 soggetti) e post trattamento PEL (Physical Emission Level) 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg. Si nota l'incremento significativo post-trattamento dei livelli sierici di NGF.

Fig. 2. Livelli sierici medi di NT3 pre trattamento espressi in ng/ml (n.236 soggetti) e
10 post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg. Si nota l'incremento significativo post-trattamento dei livelli sierici di NT3.

Fig. 3. Livelli sierici medi di NT4 pre trattamento espressi in ng/ml (n.236 soggetti) e
post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti),
15 ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg. Si nota l'incremento significativo post-trattamento dei livelli sierici di NT4.

Fig. 4. Livelli sierici medi di Serotonina pre trattamento espressi in ng/ml (n.236
soggetti) e post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4
soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg. Si nota
20 l'incremento significativo post-trattamento dei livelli sierici di Serotonina.

Fig. 5. Livelli sierici medi di Sostanza P pre trattamento espressi in pg/ml (n.236
soggetti) e post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4
soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg. Si nota
l'incremento significativo post-trattamento dei livelli sierici di Sostanza P.

25 Fig. 6. Livelli sierici di Eparina pre trattamento espressi in mg/L (n.236 soggetti) e post
trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti), ET
(2500 sec. n.4 soggetti)), Frequenza 1 volta/die per 10 gg. Si nota l'incremento
significativo post-trattamento dei livelli sierici di Eparina, espressi in mg/litro.

Fig. 7. Livelli sierici medi di -ECF-A pre trattamento espressi in attività (n.236
30 soggetti) e post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4

soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg. Si nota l'incremento significativo post-trattamento dei livelli sierici di NGF.

Fig. 8. Rapporto tra giorni di terapia e valori sierici di NGF (n. 60 soggetti). Si nota un incremento dei valori sierici di NGF, progressivo per i giorni di terapia, con massima rapidità di incremento al G10, con crescita più lenta ma graduale fino al G30, dopo di
5 che si rileva un sostanziale stato stazionario (steady state) dei livelli raggiunti al G30, che comunque non aumentano più.

Fig. 9. Soggetti con ipoacusia neurosensoriale (n.160 soggetti). Orecchio destro, audiometria ossea (AO) Terapia per 48 mesi

- 10 > Orecchio destro. Audiometria ossea pre trattamento (n. 160 soggetti)
+ (Gruppo 1B, n. 40 soggetti): Terapia PEL 10 gr/sec, ET 10 sec, Frequenza 10 volte/die. AO post trattamento
° (Gruppo 1A, n. 40 soggetti) Terapia PEL 0.2 gr/sec, ET 0.2 sec, Frequenza 1 volta/die. AO post trattamento
- 15 • (Gruppo 2, n.80 soggetti): Terapie tradizionali (farmaci vasoattivi e complessi multivitaminici ad azione specifica sull'orecchio interno). Si nota un miglioramento della soglia uditiva dopo 48 mesi di trattamento, nel gruppo 1a in media di 5 dB per orecchio e nel gruppo 1b di 10db, mentre nel gruppo 2 si è riscontrato un peggioramento in media di 5 dB per orecchio.
- 20 Fig. 10. Soggetti con ipoacusia neurosensoriale (n.160 soggetti). Orecchio sinistro, audiometria ossea (AO) Terapia per 48 mesi
< Orecchio sinistro. Audiometria ossea pre trattamento (n.160 soggetti)
+ (Gruppo 1B, n. 40 soggetti): Terapia PEL 10 gr/sec, ET 10 sec, Frequenza 10 volte/die. AO post trattamento
- 25 ° (Gruppo 1B, n. 40 soggetti): Terapia PEL 0.2 gr/sec, ET 0.2 sec, Frequenza 1 volta/die. AO post trattamento
• (Gruppo 2, n.80 soggetti): Terapie tradizionali (farmaci vasoattivi e complessi multivitaminici ad azione specifica sull'orecchio interno).

Si nota un miglioramento della soglia uditiva dopo 48 mesi di trattamento, nel gruppo 1a in media di 5 dB per orecchio e nel gruppo 1b di 10db, mentre nel gruppo 2 si è riscontrato un peggioramento in media di 5 dB per orecchio.

Fig. 11. Valutazione dell'intensità dell'acufene, in decibel hearing level, prima e dopo
5 terapia di 6 mesi

VALUTAZIONE PRE TERAPIA



n. 216 soggetti con acufene, di intensità media di 40 dB

VALUTAZIONE POST TERAPIA

+ (Gruppo B, n. 72 soggetti): Terapia: PEL 7 gr/sec, ET 1 sec, Frequenza 10
10 volte/die

° (Gruppo A, n. 72 soggetti): Terapia: PEL 7 gr/sec, ET 1 sec, Frequenza 1
volta/die

• (Gruppo C, n. 72 soggetti): Soggetti (n.72) Terapie tradizionali

Nel gruppo A si è rilevato una riduzione dell'intensità dell'acufene chè è sceso a una
15 intensità media di 25dB, nel gruppo B si è rilevato una riduzione dell'intensità
dell'acufene chè è sceso a una intensità media di 20dB e scomparso in 10 pazienti,
mentre nel gruppo C l'intensità dell'acufene è rimasta invariata.

In particolare gli inventori hanno trovato la possibilità di produrre NGF e IM endogeni,
applicando sulla mucosa del naso e dei seni paranasali e secondo specifiche
20 caratteristiche tecniche (tempo di erogazione, pressione e quantità di agente erogata
per secondo, frequenza di erogazione, durata nel tempo) un prodotto contenente un
agente in grado di provocare una irritazione.

L'efficacia del prodotto secondo l'invenzione ha luogo secondo particolari modalità
riportate nel seguito e per mezzo di erogatori commerciali di un agente, per mezzo di
25 erogatori spray commerciali, regolati per applicare le nostre sostanze alle
caratteristiche fisiche richieste.

L'agente impiegato presenta preferibilmente una osmolalità minore o uguale a quella
del sangue (osmolalità media del sangue 275-295 mOsm/kg H₂O (36); tuttavia,
30 nell'ambito della presente invenzione possono essere utilizzati anche agenti con

osmolalità superiore a quella del sangue fino al 30% (limite superiore massimo di osmolalità dell'agente fisico 283,5 mOsm/kg H₂O). La osmolalità del sangue ha delle oscillazioni dovute all'età e può raggiungere nei soggetti al di sopra di 78 anni i valori di 302,2 mOsm/kg H₂O (37). Per cui nei soggetti al di sopra di 78 anni il limite superiore massimo di osmolalità dell'agente fisico sale a 392,86 mOsm/kg H₂O. Con il termine osmolalità nell'ambito della presente invenzione si intende il numero totale di particelle osmoticamente attive dissociate in una soluzione espressa in termini di osmoli (Osm) per kg di solvente.

L'agente stimola, in maniera analoga a quanto avviene per il NGF, la produzione di altri IM Neurotrofina 3 e Neurotrofina 4, Serotonina, Sostanza P, Eparina, Fattore di chemiotassi degli eosinofili (Eosinophil chemotactic factor)(ECF-A).

L'efficacia del prodotto è legata al rispetto delle seguenti caratteristiche tecniche: quantità di erogazione da 0,2 g/sec a 30 g/sec e tempo di erogazione da 0,1 secondi a 2500 secondi per una frequenza da 1 a 34 volte al dì, in particolare con una quantità di erogazione da 5 g/sec a 15 g/sec e tempo di erogazione da 0,4 a 6 secondi per una frequenza da 1 a 10 volte al dì. Il prodotto secondo l'invenzione contiene un agente scelto dalla classe formata da Acqua distillata o Bidistillata, Acqua, Soluzione fisiologica (con NaCl da 0.9% a 0,01% con o senza aggiunta di Glucosio), Ringer, Ringer lattato, Soluzione di Hartmann, soluzione Sulfurea (in acqua o acqua distillata con quantità da 0.1 mg a 10 mg di H₂S acido solfidrico per litro), Acqua alcalina ionizzata (AIW) (di PH compreso tra 8 e 11), Acqua deionizzata. La durata della terapia è legata alle necessità del singolo paziente.

Gli agenti impiegati, al contrario di quanto descritto nella *prior art*, provocano a seguito dell'applicazione una irritazione che in conseguenza richiama nel tessuto irritato tra i leucociti in particolare i mastociti. I mastociti sono così stimolati direttamente e/o indirettamente a liberare e produrre NGF endogeno e tutti i mediatori dell'infiammazione nella zona di flogosi senza creare effetti collaterali tipici di altre sostanze irritanti. Tale agente provoca una infiammazione di tipo irritativo, che non è dannosa ed è reversibile, e al contempo in grado di stimolare la produzione autogena in tutta la mucosa nasale ivi compresi i turbinati inferiori, medi, superiori e in tutta la

mucosa dei seni mascellari, etmoidali, frontali, sfenoidali di NGF e di tutti i mediatori dell'infiammazione, e viene usato nel trattamento di patologie come meglio esemplificato nel seguito. Allo scopo di assicurare che NGF prodotto e che tutti i mediatori dell'infiammazione prodotti con il nostro stimolo: Neurotrofina 3 e
5 Neurotrofina 4, Serotonina, Sostanza P, Eparina, Fattore di chemiotassi degli eosinofili (Eosinophil chemotactic factor)(ECF-A) , ma anche, Triptasi, Istamina, Proteoglicani, Fattore di attivazione piastrinica (Platelet activating factor) (PAF), TNF-alpha, Triptasi, Chemochine, Istamina, Specie di ossigeno reattivo (ROS), Interleuchina 1 (IL-1), Inflammasomi, Bradichinina, Prostaglandine e Leucotrieni, raggiungessero il cervello, superando pertanto la barriera emato-encefalica considerata impermeabile, si è seguita una somministrazione attraverso il naso ad azione sulla mucosa del naso e dei seni paranasali. Dato che il naso ed i seni etmoidali, mascellari, sfenoidali, frontali sono rivestiti da mucosa in continuit  anatomica e con le stesse componenti istologiche, si   stimolata la produzione di NGF autogeno e di tutti i mediatori
15 dell'infiammazione sopra elencati in tutta la mucosa nasale ivi compresi i turbinati inferiori, medi, superiori e in tutta la mucosa dei seni mascellari, etmoidali, frontali, sfenoidali. Da qui NGF e tutti i mediatori dell'infiammazione sopra elencati prodotti possono giungere all'encefalo sfruttando 1) la diffusione alla circolazione ematica sfruttando le vie di drenaggio linfatico e da qui in tutto l'organismo, oppure 2) la
20 diffusione attraverso la volta della cavit  nasale, la lamina cribrosa, la via olfattoria e quindi l'encefalo oppure 3) la via di diffusione attraverso il dotto naso lacrimale, il sacco naso lacrimale, la sclera, il nervo ottico e quindi l'encefalo.

ESPERIMENTO 1. Studio per la definizione dei parametri fisici di erogazione

Sono stati selezionati 236 soggetti volontari e informati ai quali   stato eseguito un
25 prelievo ematico pretrattamento per la valutazione sul siero delle concentrazioni dei Mediatori dell'infiammazione (IF): NGF endogeno e degli altri mediatori dell'infiammazione: Neurotrofina 3 e Neurotrofina 4, Serotonina, Sostanza P, Eparina, Fattore di chemiotassi degli eosinofili Eosinophil chemotactic factor)(ECF-A)

I volontari sono stati selezionati in 59 gruppi di 4 soggetti ognuno. Ogni gruppo di
30 quattro soggetti   stato sottoposto a tutte le rilevazioni che incrociano un singolo

parametro del tempo di erogazione con tutti gli altri. ad esempio 0,10 secondi di erogazione per le 48 differenti modalità di erogazione in g/sec. considerate.

Dopo 40 minuti da ogni trattamento è stato eseguito un prelievo ematico per lo studio della concentrazione sierica di IM post trattamento. Dopo ogni prelievo, per ragioni di compliance dei soggetti in studio, si è posta una pausa di una settimana. Il periodo di studio per i vari impedimenti sopravvenuti nei singoli partecipanti è risultato di due anni. 236 soggetti hanno eseguito ognuno 48 rilevazioni. Sono state così eseguite 11.328 rilevazioni.

Tutti i soggetti sono stati poi trattati con erogazione di spray naso paranasale di acqua distillata. Vantaggiosamente per l'applicazione dell'agente irritante della presente invenzione si sono utilizzati erogatori simili a quelli già in commercio, realizzati tuttavia per erogare le nostre sostanze alle caratteristiche fisiche richieste. In questo esperimento le caratteristiche fisiche di ogni erogazione sono state da 0,1 gr/sec a 30 gr/sec con tempo di erogazione da 0,01 secondi a 2500 secondi, per una frequenza di 1 volta al dì per dieci giorni, secondo lo schema sotto indicato.

VALORI GRUPPO 1- gr/sec (nel seguito definiti physical emission levels PEL)

Quarantotto gruppi con PEL da 0,10 gr/sec a 30,00 gr/sec.

0.10; 0.11; 0.12; 0.13; 0.14; 0.15; 0.16; 0.17; 0.18; 0.19;

0.20; 0.30; 0.40; 0.50; 0.60; 0.70; 0.80; 0.90; 1.00; 2.00;

3.00; 4.00; 5.00; 6.00; 7.00; 8.00; 9.00; 10.00; 11.00; 12.00;

13.00; 14.00; 15.00; 16.00; 17.00; 18.00; 19.00; 20.00; 21.00; 22.00;

23.00; 24.00; 25.00; 26.00; 27.00; 28.00; 29.00; **30.00** gr/sec

VALORI GRUPPO 2 –TEMPO DI EROGAZIONE-(da noi chiamati emission time ET)

In cinquantanove gruppi con tempo di erogazione da 0.01 secondi a 2500 secondi.

25

0.01sec, 0.02; 0.03; 0.04; 0.05; 0.06; 0.07; 0.08; 0.09;

0.10 sec; 0.11; 0.12; 0.13; 0.14; 0.15; 0.16; 0.17; 0.18; 0.19;

0.20; 0.30; 0.40; 0.50; 0.60; 0.70; 0.80; 0.90; 1.00; 2.00;

3.00; 4.00; 5.00; 6.00; 7.00; 8.00; 9.00; 10.00; 11.00; 12.00;

30 13.00; 14.00; 15.00; 16.00; 17.00; 18.00; 19.00; 20.00; 21.00; 22.00;

23.00; 24.00; 25.00, 50,00; 100,00; 200,00; 400,00; 800,00; 1500,00; **2500,00** sec

Dati di laboratorio

I dati riportati nel seguito e rilevati nel corso di esperimenti sono rappresentativi dell'efficacia del trattamento per la produzione endogena dei seguenti IM:

5 **NGF**

I valori medi pretrattamento erano di $3.7 \pm 1,5$ pg/ml. Post trattamento si è rilevato: Per PEL 5 gr/sec per ET 0.4 sec NGF va a 16,3 pg/ml in media, post-trattamento. A 5 gr/sec per ET 2 sec NGF va a 22.3 pg/ml in media, post trattamento mentre a PEL 5 gr/sec per ET 2500,00 sec., NGF va a 61.3 pg/ml in media, post trattamento. 8 (**Fig. 1**).

NT3

I valori medi pretrattamento erano di 0.8 ± 0.4 ng/ml. Post trattamento si è rilevato: Per PEL 5 gr/sec per ET 0.4 sec, NT3 va a 203 ng/ml in media, post-trattamento. A PEL 5 gr/sec per ET 2 sec., NT3 va a 516 ng/ml in media, post trattamento mentre a 5 gr/sec per 2500,00 sec NT3 va a 2617 ng/ml. in media, post trattamento (38) (**Fig. 2**).

NT4

I valori medi pretrattamento erano di 0.5 ± 0.3 ng/ml. Post trattamento si è rilevato: Per 5 gr/sec per ET 0.4 sec., NT4 va a 190 ng/ml in media, post-trattamento. A 5 gr/sec per 2 sec., NT4 va a 550 ng/ml in media, post trattamento mentre a 5 gr/sec per 2500,00 sec NT4 va a 2400 ng/ml in media, post trattamento. (**Fig. 3**).

SEROTONINA

I valori medi pretrattamento erano di 91 ± 23 ng/ml. Post trattamento si è rilevato: Per 5 gr/sec per 0.4 sec., Serotonina va a 111 ng/ml in media, post-trattamento. A 5 gr/sec per 2 sec., Serotonina va a 179 ng/ml in media, post trattamento mentre a 5 gr/sec per 2500,00 sec., Serotonina va a 281 ng/ml. in media, post trattamento (**Fig. 4**).

SOSTANZA P

I valori medi pretrattamento erano di $282 \pm (110)$ pg/ml. Post trattamento si è rilevato: Per 5 gr/sec per 0.4 sec, Sostanza P va a 346 pg/ml in media, post-trattamento. A 5 gr/sec per 2 sec., Sostanza P va a 462 pg/ml in media, post trattamento mentre a 5

gr/sec per 2500,00 sec., Sostanza P va a 680 pg/ml in media, post trattamento (**Fig. 5**).

EPARINA

I valori medi pretrattamento erano di 1.65 mg/litro (39). Post trattamento si è rilevato:

- 5 Per 5 gr/sec per 0.4 sec, Eparina va a 2,16 mg/litro in media, post-trattamento. A 5 gr/sec per 2 sec., Eparina va a 2,32 mg/litro in media, post trattamento mentre a 5 gr/sec per 2500,00 sec., Eparina va a 3,05 mg/litro in media, post trattamento (**Fig. 6**).

ECF-A

- L'attività è definita come numero di eosinofili che migrano completamente attraverso
 10 un filtro in 5 campi a caso a 450x di ingrandimento (utilizzando vit B 12 e Fenolo rosso come markers molecolari). I valori rilevati pre-trattamento sono stati definiti di valore 1. Post trattamento si è rilevato: Per 5 gr/sec per 0.4 sec., ECF-A va a 4,1 in media, post-trattamento. A 5 gr/sec per 2 sec, ECF-A va a 6.3 in media, post trattamento mentre a 5 gr/sec per 2500,00 sec ECF-A va a 10.2. in media, post trattamento (40)
 15 (**Fig. 7**).

Dall'analisi dei dati si è rilevato che i valori degli IM per i VALORI GRUPPO 1- GR/SEC di PEL davano modificazioni non significative da 0.1 fino a 0.19 gr/sec. per qualsiasi valore di ET mentre i VALORI GRUPPO 2 –TEMPO DI EROGAZIONE davano modificazioni non significative da 0.01 fino a 0.09 secondi per qualsiasi valore di PEL.

- 20 Dall'analisi dei dati si è anche osservato che per ET a 0.1 sec si ottenevano a PEL 5 gr/sec. incrementi significativi per $P < 0.05$, in un trend di maggiore significatività che vedeva a 7 gr/sec $P < 0.01$ mentre a 30 gr/ sec $P < 0.001$. (disconfort accusato dal 100% dei soggetti che asserivano che non avrebbero sopportato un valore superiore). Era così stata definita la soglia minima efficace per PEL gr/sec: soglia 0.2 e per ET tempo
 25 di erogazione in sec: soglia 0.1.

Inoltre, era stato trovato il massimo di PEL in gr/sec tollerata per ET di 0.1 sec o superiori (soglia 30 gr/sec) ma con disagio accusato dai soggetti che asserivano che non avrebbero sopportato un valore superiore.

Di converso utilizzando la soglia 0.2 per la PEL gr/sec o superiori il massimo di ET che si è utilizzato è stato mediamente 2500 sec (con il 100% di pazienti che accusavano disagio) e si ottenevano incrementi pari a $P < 0.001$.

Il valore di 30 gr/sec e quello di 2500,00 sec (ET) erano quelli massimi tollerati dai
5 soggetti, che riferivano che non si sarebbero sottoposti a trattamenti con valori superiori, in tal modo definendo la soglia massima nel trattamento secondo l'invenzione, da non oltrepassare, sia per PEL gr/sec che per ET in sec.

Lo studio ha consentito anche di evidenziare l'esistenza di un valore di proporzionalità diretta tra i valori di ET e di PEL e la produzione dei mediatori dell'infiammazione (IM)
10 e in particolare di NT3, NT4, NGF, Serotonina, ECFA, Sostanza P.

Gli inventori della presente invenzione hanno pertanto determinato le seguenti caratteristiche tecniche dell'invenzione:

Caratteristica tecnica 1, *ottima efficacia e tollerabilità dell'acqua distillata.*

Caratteristica tecnica 2, *valori efficaci di PEL e di ET per ogni erogazione. PEL: da*
15 *0,2 gr/sec a 30 gr/sec., ET da 0,1 sec a 2500 sec.*

Caratteristica tecnica 3, *soglia minima di efficacia (minimum effective stimulation level: MESL). PEL inefficace al di sotto di 0,2 gr/sec. ET inefficace al di sotto di 0,1 sec.*

Caratteristica tecnica 4, *soglia massima di fastidio (discomfort level: DL). PEL rifiutata*
20 *dai soggetti per valori al di sopra di 30 gr/sec. ET rifiutata dai soggetti per valori al di sopra di 2500 sec.*

Caratteristica tecnica 5, *su proporzionalità diretta tra valori di PEL ed ET e liberazione di IM.*

Allo scopo di realizzare una terapia ben tollerata dai pazienti, utilizzando i valori di PEL
25 e di ET più efficaci ma tollerabili, specie in vista del fatto che molte delle malattie nervose e degenerative hanno bisogno di una terapia cronica .sono stati effettuati ulteriori studi che hanno portato a determinare le seguenti ulteriori caratteristiche.

Caratteristica tecnica 6. *i parametri più efficaci tra quelli molto ben tollerati dai*
soggetti in esame sono risultati da 5 a 15 gr/ sec per un tempo da 0.4 sec a 6 sec:
30 *incremento degli IM per $P < 0.01$.*

Caratteristica tecnica 7. PEL ed ET: Si può aumentare un parametro e diminuire proporzionalmente l'altro a patto di rimanere oltre la soglia minima di efficacia (minimum effective stimulation level: MESL). , per avere risultati simili di incremento degli IM

5 Si era così avanzati nella conoscenza dei parametri della terapia, in particolare si erano scoperte le seguenti caratteristiche tecniche:

- efficacia e tollerabilità dell'acqua distillata
- valori efficaci di PEL e di ET,
- soglia minima di efficacia (minimum effective stimulation level: MESL).,
- 10 • soglia massima di fastidio (discomfort level: DL),
- proporzionalità diretta tra valori di PEL ed ET e liberazione di IM
- Parametri migliori per efficacia e tollerabilità
- PEL ed ET. Interscambiabilità dei parametri entro la SME

Si trattava ora di verificare l'uso di altre sostanze, definire la frequenza giornaliera della erogazione e gli effetti terapeutici in base al tempo di trattamento.

15 **ESPERIMENTO 2. PER VERIFICARE L'USO DI ALTRE SOSTANZE, DEFINIRE LA FREQUENZA GIORNALIERA DELLA EROGAZIONE E GLI EFFETTI TERAPEUTICI IN BASE AL TEMPO DI TRATTAMENTO**

Test ulteriori sono stati svolti su un gruppo di duecentoventi persone. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a prelievo prima del trattamento, a trattamento mediante erogazione naso-paranasale con un liquido seguente: Acqua distillata o bidistillata, Acqua, Soluzione fisiologica (con NaCl da 0.9% a 0,01% con o senza aggiunta di Glucosio), 0.9%, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1%, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01%, Ringer, Ringer lattato, Soluzione di Hartmann, Soluzione
25 sulfurea (Acqua o acqua distillata con quantità da 0.1 mg a 10 mg di H₂S acido solfidrico per litro), 10,0 mg/l, 9,0, 8,0, 7,0, 6,0, 5,0, 4,0, 3,0, 2,0, 1,0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1%, Acqua di mare (in cui la concentrazione media dei sali disciolti varia da 25 a 50 g/l composta in maggioranza di cloruro di sodio, con la presenza di nitrati, fosfati, ossigeno e anidride carbonica): 50,0 g/l, 50,0, 49,0, 48,0, 47,0, 46,0,
30 45,0, 44,0, 43,0, 42,0, 41,0 mg/l, 40,0, 39,0, 38,0, 37,0, 36,0, 35,0, 34,0, 33,0, 32,0,

31.0, 30.0, 29.0, 28.0, 27.0, 26.0, 25.0, Acqua Alcalina Ionizzata (AIW) (di PH compreso tra 8 e 11) (41), Acqua deionizzata.

E' stato trovato che con tutte le sostanze utilizzate si mantenevano uguali le caratteristiche tecniche 2-3-4-5-6-7 riscontrate con acqua distillata e acqua bidistillata.

- 5 Tutti i soggetti sono stati quindi trattati con erogazione naso-paranasale delle sostanze in esame utilizzando un PEL a 5.0 gr/sec con ET a 0,4 sec per una frequenza di una volta al dì per un periodo di terapia di dieci giorni. I parametri di PEL e di ET sono stati scelti perché erano tra quelli che nel precedente esperimento con l'acqua distillata, pur essendo ben tollerati, ci facevano rilevare incrementi post-trattamento rispetto a quelli
- 10 pre-trattamento, significativi per $p < 0.01$. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a prelievo ematico prima ed a 4 ore dal termine del trattamento. Sono stati esaminati i risultati dei valori degli IM, che risultavano tutti incrementati nel siero post trattamento, è stata fatta una analisi statistica rispetto ai valori pretrattamento ed è stato comparato l'incremento degli IM nel siero post trattamento con quello ottenuto con acqua distillata
- 15 che era già stato esaminato statisticamente: $p < 0.01$.

Acqua: $p < 0.05$

Soluzione fisiologica (con NaCl da 0.9% a 0,01% con o senza aggiunta di Glucosio): $p < 0.03$

Ringer: $p < 0.05$)

- 20 Ringer lattato: $p < 0.05$

Soluzione di Hartmann: $p < 0.05$

Soluzione sulfurea (se preparata con acqua distillata con quantità di 0.1 mg o di 10 mg di H₂S acido solfidrico per litro) : $p < 0.01$ a 1mg/l di H₂S e di $p < 0.02$ a 10mg/l di H₂S.

- 25 Se invece veniva preparata con acqua si otteneva $p < 0.05$ a 1mg/l di H₂S e di $p < 0.08$ a 10mg/l di H₂S.(NB:per semplificare parliamo solo delle concentrazioni di H₂S minima e massima)

Acqua di mare (in cui la concentrazione media dei sali disciolti varia da 25 a 50 g/l : p: NON SIGNIFICATIVO

Acqua Alcalina Ionizzata (AIW) (di PH compreso tra 8 e 11), : $p < 0.05$

- 30 Acqua deionizzata: $p < 0.01$

I valori di incremento sierico degli IM post trattamento con le sostanze in esame rispetto all'acqua distillata, in valori di significatività statistica, erano:

-UGUALI: per deionizzata e per soluzione sulfurea con acqua distillata e H₂S 0,1mg/l

-MINORI: per Acqua, Soluzione fisiologica, Ringer; Ringer lattato, Soluzione di
5 Hartmann, Soluzione sulfurea(con acqua distillata e H₂S 10mg/l o soluzione sulfurea
con acqua e H₂S 0,1mg/l o H₂S 10 mg/l, Acqua Alcalina Ionizzata,

-NON SIGNIFICATIVI per Acqua di mare (in cui la concentrazione media dei sali
disciolti varia da 25 a 50 g/l.

Gli esperimenti sopra descritti dimostrano che lo stimolo irritativo per somministrazione
10 prodotto erogando secondo le modalità della presente invenzione acqua distillata è
risultato efficace anche statisticamente nell'aumentare i IM tutti .

Gli inventori partivano dal presupposto che utilizzando sostanze ben tollerate dai
mammiferi, abbastanza simili all'acqua distillata, e applicando gli stessi parametri fisici
utilizzati per l'acqua distillata, si sarebbero ritrovati risultati analoghi, ma i risultati non
15 erano comparabili e davano risposte variabili a seconda delle differenti sostanze. Si
doveva cercare di capire il motivo del differente comportamento.

Si è allora inserita una variante all'esperimento. Si è selettivamente studiata la
concentrazione di NT3 nelle secrezioni nasali prima dell'erogazione e quaranta minuti
dopo l'erogazione naso paranasale, con tutte le sostanze in esame compresa l'acqua
20 distillata, per un PEL a 7.0 gr/sec con ET a 0,4 sec. Media prima dell'erogazione 0,1
pg/ml, media dopo 70 pg/ml + 50. P<0.001. Non esistevano differenze significative con
l'acqua distillata.

Perché allora se IM si liberavano nella mucosa naso-paranasale in uguale proporzione
con tutte le sostanze esaminate nel trattamento, queste non si ritrovavano poi in
25 maniera simile per tutte nel sangue, visto che secondo noi tutte seguivano le vie
linfatiche come via di ingresso?

Si sono ricercate le ragioni dei differenti incrementi post trattamento degli IM nel
sangue, che si rilevavano tra l'acqua distillata e le altre sostanze in esame, senza
trovarle.

Finchè si è invertito il ragionamento ed il criterio di ricerca, ricercando non il perché delle differenze ma il perché delle analogie. L'acqua deionizzata, che dava risultati simili all'acqua distillata, in che cosa le era simile? Infine attraverso l'intuizione si è raggiunta la scoperta: era anch'essa ipoosmolale rispetto al sangue (con minore osmolalità, ossia con un minor contenuto di soluti rispetto al sangue).

-La veridicità di questa intuizione era confermata dal fatto che Acqua, Soluzione fisiologica, Ringer; Ringer lattato, Soluzione di Hartmann, Acqua Alcalina Ionizzata, che stimolavano l'aumento degli IM in misura inferiore rispetto all'acqua distillata, ma pur sempre in maniera statisticamente efficace, erano isoosmolali..

-Tra queste sostanze l'Acqua, il Ringer, il Ringer lattato, la soluzione di Hartmann, l'Acqua alcalina ionizzata, avevano una composizione chimica costante ed un comportamento costante nella stimolazione dei IM.

-Ad ulteriore conferma dell'ipotesi: La soluzione fisiologica, che era stata utilizzata in concentrazioni diverse di NaCl, dava valori di incremento di IM di $p < 0.01$ per concentrazione di NaCl di 0,9% quando era isoosmolale come l'Acqua, il Ringer, il Ringer lattato, la soluzione di Hartmann, l'Acqua alcalina ionizzata. Invece dava valori di incremento di IM progressivamente più significativi statisticamente con il diminuire dell'osmolalità fino a dare valori uguali all'acqua distillata quando presentava valori simili di osmolalità. In particolare: $p < 0.05$ da 0.9% a 0.7% di NaCl, $p < 0.04$ da 0.6% a 0.5%, $p < 0.03$ da 0.4% a 0.3%, $p < 0.02$ da 0.2% a 0.1%, $p < 0.01$ da 0.09% a 0.01% di NaCl.

- Ad ulteriore conferma dell'ipotesi la soluzione sulfurea, se veniva preparata con acqua distillata addizionata con H₂S 0,1 mg/l, dava valori di incremento analoghi all'acqua distillata $p < 0.01$, perché risultava ipotonica, se con 10 mg/l di H₂S, andava a incrementi minori, $p < 0.02$, perché risultava meno ipoosmolale.

Se veniva preparata con acqua e addizionata con H₂S 0,1 mg/l, risultava isotonica e dava valori di incremento simili alle altre sostanze isoosmolali $p < 0.05$, mentre se addizionata con 10 mg/l, andava a incrementi minori, $p < 0.08$, perché risultava lievemente iperosmolale. Ad ulteriore conferma dell'ipotesi, la cui veridicità risultava così confermata da quattro prove, l'acqua di mare, iperosmolale, rispetto al plasma e

rispetto alla acqua distillata, in tutte le concentrazioni utilizzate non dava mai incrementi significativi, post- trattamento, degli IM.

Avevamo scoperto quindi che nell'ambito dell'efficacia della nostra terapia, la sostanza utilizzata per lo stimolo naso-paranasale aveva una efficacia inversamente
5 proporzionale all'osmolalità (tanto più efficace quanto più ipoosmolale). I valori di incremento di produzione di IM risultavano non statisticamente significativi per valori di grande iperosmolalità ($p < NS$), significativi a partire da valori di lieve iperosmolalità, avevano valori fortemente significativi ($p < 0.05$) a valori di isoosmolalità e risultavano fortissimamente significativi ($p < 0.001$) a valori di grande ipoosmolalità.

10 **Caratteristica tecnica 8.** Efficacia massima di Acqua deionizzata analoga ad acqua distillata. Efficacia buona di Acqua, Soluzione fisiologica, Ringer; Ringer lattato, Soluzione di Hartmann, Acqua Alcalina Ionizzata, soluzione sulfurea. Esistenza di proporzionalità indiretta tra l'osmolalità del mezzo erogato e la produzione e presenza delle sostanze IM nel sangue (proporzionalità indiretta con l'efficacia della terapia).

15 Per validare ulteriormente la Caratteristica tecnica 8 sono state utilizzate le stesse sostanze che davano risultati di incremento sierico di IM significativi rispetto ai valori pre-trattamento e sono state rese iperosmolali con l'aggiunta di 5 gr/litro di NaCl in ognuna.

Acqua distillata e acqua bidistillata, acqua deionizzata, ringer, ringer lattato, soluzione
20 di Hartmann, acqua alcalina ionizzata.

Sono stati arruolati nell' esperimento venti soggetti che sono stati sottoposti a prelievo ematico prima e 4 ore dopo il trattamento che è stato eseguito con le stesse modalità: PEL a 5.0 gr/sec con ET a 0,4 sec, una volta al dì per dieci giorni. A conferma della Caratteristica tecnica 8, sono stati ritrovati nel siero valori di incremento non
25 significativi rispetto a quelli pre-trattamento.

ESPERIMENTO 3. FREQUENZA E TEMPO DI EROGAZIONE.

Sono stati arruolati sessanta soggetti volontari ed informati. E' stato effettuato il prelievo ematico ed effettuato il dosaggio sierico degli IM: in particolare Serotonina, ECFA, NT3, NT4, Sostanza P, Eparina, NGF. Sono stati tutti sottoposti ad erogazione
30 con acqua distillata per PEL a 5.0 gr/sec con ET a 0,4 sec, una volta al dì per un

giorno. Sono stati mantenuti i parametri fisici e si è aumentata la frequenza. E' stato eseguito il prelievo e lo studio delle concentrazioni sieriche dopo 40 minuti dal termine di ogni erogazione dell'agente. Vengono riportati i risultati dei dosaggi di NT3 (a titolo esemplificativo tenuto conto che il comportamento degli altri IM è risultato sostanzialmente sovrapponibile. Il valore di NT3 pre trattamento: 0.7ng/ml. post trattamento dopo 1 erogazione (frequenza 1 (f1): Media 0.8. F2: Media 1,1, F3: Media 2,1, F4: Media 9,1, con un trend di aumento direttamente proporzionale fino a F34: Media 202,2. Dalla comparazione di questi risultati con quelli ottenuti con l'esperimento 1 dove per gli stessi parametri di PEL a 5.0 gr/sec con ET a 0,4 sec, una volta al dì per dieci giorni si registravano valori di NT3 pari a 203 ng/ml, potevamo definire la Caratteristica tecnica 9.

Caratteristica tecnica 9. *La durata in giorni di terapia è più importante che la frequenza giornaliera di erogazione, infatti 1 erogazione al dì per 10 gg per un totale di 10 erogazioni raggiunge lo stesso risultato di 34 erogazioni in un solo giorno.*

Rimaneva quindi un ulteriore quesito cui trovare una risposta: Il numero ottimale di giorni di terapia. Gli stessi 60 soggetti di cui si erano rilevati i valori di IM pre trattamento, sono stati tutti sottoposti al trattamento per l'erogazione intranasale e paranasale di acqua distillata per PEL a 5.0 gr/sec con ET a 0,4 sec, una volta al dì per 60 giorni. Dopo 40 minuti dal termine di ogni giorno di trattamento, sono stati tutti sottoposti a prelievo ematico e dosaggio sierico degli IM sopra riportati.

Vengono riportate per concisione le percentuali medie di incremento o decremento rilevate dopo ogni giorno (G) di terapia del solo NGF, dato che il comportamento degli altri IM è risultato simile. NGF pre trattamento: 3.6 pg/ml.

G1: +2.7%;	G2:+4.5%;	G3:+8.7%;	G4:+30.5%;	G5:+69.3%;	G6: +108.2%
G7:+181.7%;	G8:+261.2%	G9:+302.1%;	G10:+352.7%	G11:+361.1% ;	G12:+368.9% ;
G13:+372.1% ;	G14:+389,2% ;	G15:+401.9% ;	G16:+411.2% ;	G17:+415.6% ;	G18:+427.1% ;
G19:+431.1%	G20:+458.3%	G21:+462.2%	G22:+474.4%	G23:+470.4%	G24:+465.3%

;	;	;	;	;	;
G25:+497,1%	G26:+490.5%	G27:+488.7%	G28:+500.7%	G29:+501.7%	G30:+502.2%
	;	;		;	;
G31:+499.7%	G32:+498,5%	G33:+496.5%	G34:+495.2%	G35:+491.5%	G36:+493.2%
			;	;	
G37:+491.1%	G38:+490.2%	G39:+489.2%	G40:+495.2%	G41:+499.8%	G42:+498.2%
;	;	;	;	;	;
G43:+496.9%	G44:+499.8%	G45:+497.8%	G46:+497.6%	G47:+497.5%	G48:+494.8%
;	;	;	;		;
G49:+499.5%	G50:+495.1%	G51:+496.7%	G52:+498.7%	G53:+491.7%	G54:+492.2%
;	;	;		;	;
G55:+490.1%	G56:+486.9%	G57:+486.1%	G58:+490.1%	G59:+486.1%	G60:+486.7%
;	;	;	;	;	;

Avevamo così rilevato che si otteneva un incremento degli IM esaminati:-Serotonina, Sostanza P, NT3, NT4, Eparina, ECFA, NGF, progressivo per i giorni di terapia, con massima rapidità di incremento al G10, con crescita più lenta ma graduale fino al G30, dopo di che si otteneva un sostanziale stato stazionario (steady state) dei livelli raggiunti al G30, che comunque non aumentavano più (Fig. 8). E' evidente che nelle malattie degenerative del sistema nervoso, che per la maggior parte sono malattie croniche, la più lunga durata di terapia garantisce il migliore effetto protettivo. Il prodotto dell'invenzione può essere somministrato, nel caso di malattie degenerative per tutta la durata della vita del paziente, visto che oltre ad essere efficace è anche privo di effetti collaterali.

si ha un sostanziale stato stazionario (steady state).

Dalla comparazione dell'esperimento 1 con questo esperimento 3 vedevamo ad esempio che per il NGF si riscontrava nell' esperimento 1 con una singola erogazione di acqua distillata a PEL 5gr/sec ed ET 2500 sec., un incremento a 10 gg dal valore iniziale di 3,7 pg/ml a 61,3 pg/ml, pari al 1556%, ben superiore all'incremento ottenuto con più bassi parametri di PEL e di ET, dopo 30 o 60 giorni.

Potevamo quindi definire la Caratteristica tecnica 11.

Caratteristica tecnica 11. *L'incremento dei parametri di PEL, una volta superata la soglia minima di efficacia (minimum effective stimulation level: MESL), è più efficace dell'incremento dei giorni di terapia. Provoca infatti un incremento della produzione degli IM proporzionalmente superiore rispetto all'incremento dei giorni di durata della terapia.*

Inoltre l'osservazione dei risultati codificati nella Caratteristica tecnica 10 dimostra che dopo il giorno 30 di terapia, si raggiunge uno stato stazionario (Steady state) nella produzione di NGF, NT3, NT4 e di tutti gli IM. Si ottiene insomma un effetto terapeutico efficace fintanto che si prolunga la terapia, che è ben tollerata. Per cui potevamo definire la Caratteristica tecnica 12.

Caratteristica tecnica 12. *Nelle malattie croniche del sistema nervoso, la terapia ha la migliore efficacia protettiva se mantenuta nel tempo di malattia.*

Nella **Tab. I** vengono riportate le caratteristiche tecniche del prodotto secondo l'invenzione

Tab. I. Le Caratteristiche tecniche del trattamento per stimolare nei mammiferi la produzione autogena di IM per erogazione naso paranasale di specifiche sostanze con specifici parametri fisici	
1	Ottima efficacia di acqua distillata
2	Valori efficaci di PEL e di ET per ogni erogazione: PEL da 0,2 gr/sec fino a 30 gr/sec. ET da 0.1 sec, a 2500 sec.
25	3 Soglia minima di efficacia (minimum effective stimulation level: MESL). (PEL 0.2 gr/sec; ET 0.1 sec)
	4 Soglia massima di fastidio (discomfort level: DL) (PEL 30 gr/sec, ET 2500 sec)
	5 Proporzionalità diretta tra valori di PEL ed ET e liberazione di IM
30	6 Parametri migliori di PEL e di ET per rapporto tra efficacia e tollerabilità . I parametri più efficaci tra quelli molto ben tollerati dai soggetti in esame sono risultati da 5 a 15 gr/ sec per un tempo da 0.4 sec a 6 sec
	7 PEL ed ET: Si può aumentare il valore dell'uno e diminuire proporzionalmente l'altro, a patto di rimanere oltre la SME, per avere risultati simili
35	8 Efficacia massima di Acqua deionizzata. Efficacia buona di Acqua, Soluzione fisiologica, Ringer; Ringer lattato, Soluzione di Hartmann, Acqua Alcalina

ionizzata, soluzione sulfurea, nell'ambito di una proporzionalità indiretta tra l'osmolalità del mezzo erogato e la produzione e presenza delle sostanze IM nel sangue (proporzionalità indiretta con l'efficacia della terapia).

- 5 9 La durata in giorni di terapia è più importante che la frequenza giornaliera di erogazione
- 10 10 Con l'aumentare dei giorni di trattamento, si ottiene un incremento degli IM progressivo per i giorni di terapia, con massima rapidità di incremento fino al G10, con crescita più lenta ma graduale fino al G30, dopo di che si interrompe l'incremento e si ha un sostanziale stato stazionario (steady state).
- 10 11 L'incremento dei parametri di PEL, una volta superata la soglia minima di efficacia (minimum effective stimulation level: MESL), è più importante che l'incremento dei giorni di durata della terapia.
- 12 12 Nelle malattie croniche del sistema nervoso, la terapia ha la migliore efficacia protettiva se mantenuta senza interruzione per tutta la durata della malattia
-

15

ESPERIMENTO 4. VERIFICA SUGLI ANIMALI.

Per la verifica dell'efficacia della somministrazione, sono stati utilizzati ventotto conigli di un mese di vita, della stessa razza. Un gruppo di 14 conigli, nominato gruppo 1, è stato sacrificato e si è studiato con metodo ELISA la concentrazione a livello proteico nell'encefalo del NGF. L'altro gruppo denominato gruppo 2 è stato diviso in due; 7 conigli nel gruppo 2a e sette conigli nel gruppo 2b. Ai conigli del gruppo 2a è stata somministrata acqua distillata con erogazione di spruzzo intranasale di acqua distillata per 10 volte consecutive in 12 ore, con una quantità di erogazione di 0,2 gr/sec per 0.1 sec e il gruppo 2b trattato con erogazione di spruzzo intranasale di acqua distillata 10 volte al giorno, con una quantità di erogazione di 10 gr/sec per 10 sec. Tutti i conigli del gruppo 2 sono stati sacrificati dopo quaranta minuti dall'ultima erogazione. Si sono studiati nell'encefalo i valori di NGF con metodo ELISA e li si sono comparati con quelli dei conigli pretrattamento. E' stata riscontrata la presenza media di NGF con i seguenti valori: Bulbo olfattorio: Gruppo 1: 4 pg/mg, Gruppo 2a: 12pg/mg; Gruppo 2b: 16pg/mg. Ippocampo: Gruppo1: 4pg/mg, Gruppo 2a: 5 pg/mg; Gruppo 2b: 7 pg/mg. Amigdala: Gruppo 1; 3.5pg/mg. Gruppo 2a: 4,7 pg/mg. Gruppo 2b: 6 pg/mg. Gli

aumenti della concentrazione del NGF dopo trattamento sono risultati statisticamente significativi rispetto al gruppo 1 non trattato, sia nel gruppo 2a ($p < 0.005$) che nel gruppo 2b ($p < 0.001$)(Valori di p del χ^2 Test). Si è anche valutata la concentrazione di Serotonina nel tronco encefalo dei conigli del gruppo 1 non trattati ed è risultata nel
5 liquido extracellulare pari in media a $0,09 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteine, mentre negli analoghi conigli sacrificati post trattamento è risultata di $1 \mu\text{g}/\text{mg}$. Differenza statisticamente significativa per $p < 0,001$)(Valori di p del χ^2 Test). Avevamo quindi dimostrato che un altro mediatore dell'infiammazione aumentava di concentrazione nel tronco encefalico dopo il nostro trattamento.

10 **ESPERIMENTO 5. TEST DI EFFICACIA PER L'ACUTEZZA MENTALE**

Il prodotto secondo l'invenzione è stato sperimentato su 60 volontari che hanno accettato a fronte di un compenso e che sono stati trattati con erogazione di acqua distillata 1 o 10 volte al giorno, per sei mesi, per verificare i risultati in merito alla efficienza intellettuale. I volontari di età compresa tra diciannove e cinquantacinque
15 anni, tutti con licenza liceale, sono stati randomizzati in due gruppi denominati 1 e 2, di trenta persone. Il gruppo 1 trattato con erogazione di spruzzo intranasale di acqua distillata 1 volta al giorno, con una quantità di erogazione di $0,2 \text{ gr}/\text{sec}$ per 0.2 sec e il gruppo 2 trattato con erogazione di spruzzo intranasale di acqua distillata 10 volte al giorno, con una quantità di erogazione di $10 \text{ gr}/\text{sec}$ per 10 sec .

20 Tutti i volontari sono stati sottoposti a prelievo ematico per studio dei mediatori dell'infiammazione : Ngf, Neurotrofina 3 e Neurotrofina 4, Serotonina, Sostanza P, Eparina, Fattore di chemiotassi degli eosinofili.(Eosinophil chemotactic factor)(ECF-A), prima del trattamento ed al termine del trattamento.

A 15 soggetti del gruppo 1 e 15 del gruppo 2 è stato sottoposto un test di acutezza
25 mentale A e dopo sei mesi un test di analoga complessità B e per contro a quindici soggetti del gruppo 1 e quindici soggetti del gruppo 2 è stato sottoposto un test di acutezza mentale B e dopo sei mesi un test di analoga complessità A, sempre alle dieci di mattina della domenica. Si tratta di trenta domande a quattro risposte multiple cui rispondere ad ognuna entro 30 secondi. Prima del trattamento si sono avute 499
30 risposte esatte dal gruppo 1 e 491 dal gruppo 2 mentre al termine del trattamento la

media globale ha visto 554 risposte esatte dal gruppo 1 e 602 risposte esatte dal gruppo 2. All'analisi statistica i valori di p del χ^2 Test sono risultati significativi per un miglioramento dell'acutezza mentale nel gruppo 1 pari a $p < 0,05$ e nel gruppo 2 pari a $p < 0,001$). L'incremento post terapia dei valori di NGF e la sua azione di protezione delle cellule nervose appariva significativo anche statisticamente nel gruppo 1 e dava ancora migliori risultati nello stimolo a maggiore frequenza e maggiore quantità di erogazione.

I valori dei mediatori dell'infiammazione rilevati nel sangue prima e al termine del trattamento, nella comparazione globale e per singolo soggetto, sono risultati nel gruppo 1 superiori al termine del trattamento rispetto all'inizio, per ogni mediatore: NGF:+ 138%, Neurotrofina 3 + 1210% e Neurotrofina 4:+ 1144%, Serotonina:+ 40%, Sostanza P:+ 42%, Eparina:+38%, Fattore di chemiotassi degli eosinofili. (Eosinophil chemotactic factor) (ECF-A): +112%. L'incremento post trattamento rispetto ai valori pre trattamento è risultato statisticamente significativo per NT3 e NT4 per $p < 0,0001$, per NGF ed ECF-A per $p < 0,005$, per gli altri per $p < 0,05$.(valori di p del χ^2 Test).

I valori dei mediatori dell'infiammazione rilevati nel sangue prima e al termine del trattamento, nella comparazione globale e per singolo soggetto, sono risultati anche nel gruppo 2 superiori al termine del trattamento rispetto all'inizio, per ogni mediatore: NGF:+ 642%, Neurotrofina 3 +123.650% e Neurotrofina 4:+176.900%, Serotonina:+ 235%, Sostanza P:+ 245%, Eparina:+42%, Fattore di chemiotassi degli eosinofili (Eosinophil chemotactic factor)(ECF-A):+608%. L'incremento post trattamento rispetto ai valori pre trattamento è risultato statisticamente significativo per NT3 e NT4 per $p < 0,00001$, per NGF ed per $p < 0,0001$, per gli altri per $p < 0,05$.(valori di p del χ^2 Test). Si segnalano nel gruppo 2 in particolare gli incrementi di NT4 che va da 0.5 a 885 ng/ml e di NT3 che va da 0.8 a 990ng/ml. Veniva quindi confermato che i fattori dell'infiammazione venivano effettivamente prodotti localmente dalla mucosa naso paranasale grazie al nostro stimolo su quel tessuto. Raggiungevano poi da qui la circolazione ematica attraverso le vie di drenaggio linfatico verso il sistema circolatorio ed infatti trovavamo nel sangue un incremento della concentrazione dei mediatori dell'infiammazione. Questo incremento era significativo statisticamente già con lo

stimolo a minore frequenza e minore quantità di erogazione per divenire ancora più significativo con lo stimolo a maggiore frequenza e maggiore quantità di erogazione ad ulteriore riprova dell'efficacia del nostro trattamento.

ESPERIMENTO 6. TEST DI EFFICACIA SU PAZIENTI AFFETTI DA IPOACUSIA NEUROSENSORIALE

Sono stati anche trattati pazienti sofferenti di ipoacusia neurosensoriale bilaterale (INB) (abbassamento di udito irreversibile da sofferenza delle cellule uditive dell'orecchio interno). Questa patologia è considerata oggi dalla scienza medica non curabile con effetti positivi e progressivamente ingravescente. 160 pazienti (volontari e informati), 80 maschi e 80 femmine, affetti da INB con soglia audiometrica media tra 50 e 80 dB per le frequenze da 125HZ a 8000 HZ di età variabile da 18 a 75 anni sono stati randomizzati in due gruppi di 40 soggetti, detti gruppo 1 e gruppo 2. Il gruppo 1 diviso in due sottogruppi di 40 soggetti, detti 1a ed 1b: Il gruppo 1a trattato con erogazione di spruzzo intranasale di acqua distillata 1 volta al giorno, con una quantità di erogazione di 0,2 gr/sec per 0.2 sec., mentre il gruppo 1b trattato con erogazione di spruzzo intranasale di acqua distillata 10 volte al giorno, con una quantità di erogazione di 10 gr/sec per 10 sec. per 48 mesi.

Il gruppo 2, utilizzato come controllo, è stato trattato con i comuni farmaci in commercio (farmaci vasoattivi e complessi multivitaminici ad azione specifica sull'orecchio interno). Dopo quarantotto mesi di trattamento si è riscontrato un miglioramento della soglia uditiva nel gruppo 1, trattato con il nostro metodo, in media di 5 dB per orecchio nel gruppo 1a, e di 10db nel gruppo 1b mentre nel gruppo 2 si è riscontrato un peggioramento in media di 5 dB per orecchio, con una differenza statisticamente significativa a favore del primo trattamento per $P < 0.001$ sia per il gruppo 1a che per 1b. Inoltre confrontando gli audiogrammi del gruppo 1a pre e post trattamento si è ottenuta una differenza statisticamente significativa dei miglioramenti ottenuti, per $p < 0.005$ e nel gruppo 1b per $p < 0.001$, mentre il gruppo 2 ha rappresentato invece un peggioramento post trattamento significativo per $p < 0,005$ (Figg.9-10).

In tutti i soggetti inseriti nell' esperimento è stata misurata la concentrazione ematica dei mediatori dell'infiammazione come nell' esperimento 5 (test di acutezza mentale). I valori dei mediatori dell'infiammazione rilevati nel sangue prima e al termine del trattamento, nella comparazione globale e per singolo soggetto, sono risultati nel gruppo 1a superiori al termine del trattamento rispetto all'inizio, per ogni mediatore:

5 NGF: +120%, , Neurotrofina 3 +1010% e Neurotrofina 4:+ 1244%,. Serotonina:+ 44%, Sostanza P:+ 45%, Eparina:+ 42%, Eosinophil chemotactic factor (ECF-A) :+115%. L'incremento post trattamento rispetto ai valori pre trattamento è risultato statisticamente significativo per NT3 e NT4 per $p < 0,0001$, per NGF ed ECF-A per $p < 0,005$, per Serotonina, Sostanza P, Eparina per $p < 0.05$.(valori di p del χ^2 Test).

I valori dei mediatori dell'infiammazione rilevati nel sangue prima e al termine del trattamento, nella comparazione globale e per singolo soggetto, sono risultati anche nel gruppo 1b superiori al termine del trattamento rispetto all'inizio, per ogni mediatore:

15 NGF:+ 669%, Neurotrofina 3 +131.328% e Neurotrofina 4:+214.900%, Serotonina:+ 219%, Sostanza P:+ 239%, Eparina:+44%, (Eosinophil chemotactic factor)(ECF-A) :+582%.

L'incremento post trattamento nel gruppo 1b rispetto ai valori pre trattamento è risultato statisticamente significativo per NT3 e NT4 per $p < 0,00001$, per NGF ed ECF-A per $p < 0,0001$, per Serotonina, Sostanza P, Eparina per $p < 0.05$.(valori di p del χ^2 Test). Si segnalano nel gruppo 1b in particolare gli incrementi di NT4 che va da 0.4 a 860 ng/ml e di NT3 che va da 0.7 a 920ng/ml.

Nel gruppo 2, non trattato con la nostra invenzione, non è stata rilevata nessuna differenza significativa tra le concentrazioni sieriche degli IM prima e dopo il trattamento..

25 Anche in questo test l'azione sia del NGF che di NT3 e di NT4 di protezione delle cellule nervose appariva significativa anche statisticamente. I risultati erano ancora migliori nello stimolo a maggiore frequenza e maggiore quantità di erogazione.

Inoltre si confermava quanto evidente nel test 1: i fattori dell'infiammazione, prodotti localmente dalla mucosa naso paranasale grazie al nostro stimolo su quel tessuto,

30 raggiungevano poi da qui la circolazione ematica attraverso le vie di drenaggio linfatico

verso il sistema circolatorio e la produzione dei mediatori dell'infiammazione aveva un incremento statisticamente significativo già con lo stimolo a minore frequenza e minore quantità di erogazione ma ancora migliori risultati si ottenevano con lo stimolo a maggiore frequenza e maggiore quantità di erogazione.

5 **ESPERIMENTO 7. TEST DI EFFICACIA DELL'AUMENTO DELLA SEROTONINA. ULTERIORI VALUTAZIONI SUI PAZIENTI ARRUOLATI NELL'ESPERIMENTO 6**

Per valutare l'effetto dell'aumento di produzione e rilascio della Serotonina, è stato consegnato un questionario ai 20 soggetti in esame del gruppo 1a, con le domande da compilare prima e durante il trattamento:

- 10 1) Definire il livello di FAME prima e durante il trattamento, in scala da 0 a 10, dove 0= nessuna fame e 10=fame enorme.

Risultati: media pre-trattamento= 6, media durante il trattamento= 4.5. La riduzione del livello di fame post trattamento rispetto ai valori pre trattamento è risultata statisticamente significativa per $p < 0,05$. (valori di p del χ^2 Test).

- 15 2) Definire il LIVELLO DI BUONUMORE prima e durante il trattamento in scala da 0 a 10, dove 0= umore terribile e 10= umore eccezionale.

Risultati: media pre-trattamento= 5, media post-trattamento=7. L'aumento del buonumore post trattamento rispetto ai valori pre trattamento è risultato statisticamente significativo per $p < 0,05$. (valori di p del χ^2 Test).

- 20 3) Definire la QUALITÀ DEL SONNO prima e durante il trattamento in scala da 0 a 10 dove 0 = sonno terribile e 10 = sonno eccezionale. Durante il trattamento la fame è Diminuita moltissimo, Diminuita molto, Diminuita un poco, Rimasta uguale, Aumentata moltissimo, Aumentata molto, Aumentata un poco.

- Risultati: media pre-trattamento 5, media post-trattamento 7. Il miglioramento durante
25 il trattamento rispetto ai valori pre trattamento è risultato statisticamente significativo per $p < 0,05$. (valori di p del χ^2 Test).

- 4) A 20 soggetti di sesso maschile, di età compresa tra 20 e 65 anni, sessualmente attivi, è stata posta la domanda: Definire *la qualità e la durata dell'atto sessuale con lo stesso partner* nell'anno precedente il trattamento e durante il trattamento in scala da

0 a 10 dove 0 = atto sessuale di nessuna personale soddisfazione e 10 = atto sessuale di soddisfazione personale eccezionale.

Risultati: media pre-trattamento 5, media post-trattamento 8. Il miglioramento durante il trattamento rispetto ai valori pre trattamento è risultato statisticamente significativo per $p < 0,001$. (valori di p del χ^2 Test).

Per valutare l'effetto dell'aumento di produzione e rilascio della SOSTANZA P, sono stati invitati i soggetti in esame a misurarsi la pressione arteriosa o sono stati invitati i genitori a registrarla ai figli nel caso dei minorenni prima e durante la terapia, sempre alle dieci di mattina.

Risultati: media pre trattamento 140/80 (media rilevata nella settimana precedente), mentre durante il trattamento 120/65 (media rilevata in tutto il periodo di terapia). La riduzione della pressione arteriosa durante il trattamento rispetto ai valori pre trattamento è risultata statisticamente significativa per $p < 0,05$. (valori di p del χ^2 Test).

Per valutare l'effetto dell'aumento di produzione e rilascio del fattore di chemiotassi degli eosinofili (ECF-A) i soggetti in esame hanno risposto alla domanda: Definire per frequenza e gravità gli episodi infettivi nell'anno pre trattamento e nel periodo di trattamento, in scala da 0 a 10, dove 0= situazione pessima e 10= situazione eccezionale.

Risultati: media pre-trattamento 5,5 media post-trattamento 7,5.
La riduzione degli episodi infettivi per frequenza e gravità durante il trattamento rispetto ai valori pre trattamento è risultata statisticamente significativa per $p < 0,05$. (valori di p del χ^2 Test).

25 **ESPERIMENTO 8. VALUTAZIONE DELLA EFFICACIA SUGLI ACUFENI**

In un altro esperimento sono stati selezionati 250 soggetti con acufene da almeno trenta giorni, percepito nell'orecchio destro o sinistro o in maniera indefinita in testa.

L'acufene è una sensazione uditiva che non corrisponde ad uno stimolo acustico, è dovuto alla sofferenza delle cellule uditive dell'orecchio interno per traumi infiammatori,

infettivi, da esposizione cronica e/o acuta a rumore intenso, da vasculopatia e da molte

altre cause. Trattandosi di una sofferenza del tessuto nervoso, è ribelle alle terapie attuali, tanto che una volta instauratosi rimane presente spesso per tutta la vita, spesso aumentando il grado di intensità ed il fastidio per il paziente.

Tutti i pazienti, informati e retribuiti per essere arruolati nell' esperimento, sono stati
5 visitati da un Otorinolaringoiatra, retribuito per questo, per escludere cause estranee alla sofferenza delle cellule uditive. Sono stati così esclusi pazienti con dermatiti o infezioni dell'orecchio esterno, con otiti acute o croniche, con perforazioni timpaniche, con malattie dell'orecchio medio come ad es, l'otosclerosi. Sono stati così selezionati 216 soggetti. Tutti hanno eseguito un esame audiometrico ed una misurazione
10 dell'intensità dell'acufene: acufenometria, per definire la frequenza in hertz (Hz) e l'intensità in decibel (dB) dell'acufene.

I pazienti sono stati divisi in tre gruppi: gruppo A, gruppo B, gruppo C, ciascuno di 72 soggetti, randomizzando i soggetti in modo che la soglia media di intensità dell'acufene percepito fosse di trenta dB, mentre il parametro della frequenza a 1-2-4-
15 8 KHZ non veniva considerato. Il gruppo A è stato trattato con erogazione naso paranasale di acqua distillata a 7 gr/sec per 1 secondo per 1 erogazione al dì per sei mesi, mentre il gruppo B con 10 erogazioni al dì per sei mesi. Il gruppo C è stato trattato con la somma delle terapie più in uso (vasoattivi del microcircolo, complessi polivitaminici, antiossidanti, ginko biloba).

20 Al termine dei sei mesi tutti i soggetti si sono sottoposti a nuovo esame audiometrico ed acufenometria. Nel gruppo A si è rilevato un miglioramento dell'acufene chè è sceso a 25dB in media di intensità, nel gruppo B abbiamo rilevato un miglioramento dell'acufene chè è sceso a 20dB in media di intensità e scomparso in 10 pazienti, mentre nel gruppo C è rimasto invariato (**Fig. 11**).

25 Si è avuta così una ulteriore conferma dell'efficacia sulle cellule nervose della terapia ideata dagli inventori.

ESPERIMENTO 9. PER TESTARE LA MASSIMA FREQUENZA AL MASSIMO VALORE DI ET

Si segnala che sugli autori e su un gruppo di dieci familiari è stata provata la
30 tollerabilità della terapia alla PEL di 5 gr/sec ed alla ET massima di terapia (2500

secondi pari a 41,66 minuti) per il massimo di frequenza a questo parametro (34 volte al dì, ossia in 23,61 ore) per sette giorni festivi consecutivi ed è stato rilevato che a questa frequenza la terapia è fastidiosa e stancante, ma tollerabile in relazione ai benefici attesi.

- 5 Il prodotto secondo l'invenzione trova impiego nella stimolazione di NGF endogeno per uso in un trattamento di prevenzione e terapia delle patologie del sistema nervoso centrale o periferico, delle patologie dell'apparato uditivo o visivo, della perdita dell'olfatto o dei capelli o per aumentare l'efficienza del sistema nervoso e stimolare una maggiore acutezza mentale. Per ciò che riguarda le patologie che trovano
- 10 beneficio da uno stimolo della produzione di NGF endogeno si possono citare quelle che appartengono alla classe formata da Sclerosi multipla, Sindrome di Parkinson, Apoplessia (Ictus), Paralisi progressiva, Tabes dorsalis, Morbo di Alzheimer, Meningoencefalite virale, Meningite batterica, Malattie del sistema nervoso periferico, Malattie di nervi periferici; Nevralgie quali Sindrome sciatica (Ischialgia), Nevralgia del
- 15 trigemino, Nevralgia intercostale; Lesioni quali Paralisi e paresi, sindrome di Horner, Infezioni di nervi quali poliomielite; herpes zoster, Disturbi sensoriali quali Disturbi quantitativi, Disturbi qualitativi (disestesia), Disturbi dissociativi; Disturbi del sistema nervoso in generale quali Irrequietezza e insonnia, Distonia vegetativa, Neurastenia, Stati depressivi, Esaurimenti nervosi, Cefalea; Neuropatie quali Mononeuropatie,
- 20 Mononeuropatie multiple, Polineuropatie, Disturbi nervosi quali Afasia, Amnesia, Agnosia, Aprassia, Dislessia, Esiti di ictus o di embolia gassosa o di emorragia cerebrale, Patologie dell'apparato uditivo quali Acufeni, Presbiacusia, Ipoacusia neurosensoriale improvvisa, Ipoacusia neurosensoriale progressiva, Riduzione o perdita dell'olfatto, Patologie dell'apparato visivo quali malattie della cornea e della
- 25 sclera (cheratiti, distrofie, scleriti, episcleriti, etc.), glaucoma, malattie della retina (patologia vascolare, retinopatie diabetiche, degenerazione maculare), malattie della coroide (coroiditi, tumori, etc.); malattie del nervo ottico (neuriti, otticopatie, etc.); Patologie cutanee quali eritema solare, dermatite atopica, linfoma cutaneo a cellule T, ca spinocellulare, sclerodermia, lesioni iperproliferative paraneoplastiche, psoriasi,

Perdita dei capelli, Per aumentare l'attività intellettuale; Protezione dall'invecchiamento cerebrale e dalla riduzione dell'efficienza delle funzioni cerebrali.

Prodotto secondo almeno una delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui detti IM appartengono alla classe formata dai seguenti composti Neurotrofina 3 e Neurotrofina 4, Serotonina, Sostanza P, Eparina, Fattore di chemiotassi degli eosinofili (Eosinophil chemotactic factor ECF-A).

Per ciò che riguarda le patologie che trovano beneficio da uno stimolo della produzione di NT3 e NT4 endogeni si possono citare quelle dell'apparato uditivo o visivo, della perdita dell'olfatto o dei capelli o per aumentare l'efficienza del sistema nervoso e stimolare una maggiore acutezza mentale e per la prevenzione e terapia di malattie degenerative del Sistema nervoso centrale quali Sclerosi multipla, Sindrome di Parkinson, Apoplezia (Ictus), Paralisi progressiva, Tabes dorsalis, Morbo di Alzheimer, Meningoencefalite virale, Meningite batterica, Malattie del sistema nervoso periferico, Malattie di nervi periferici; Nevralgie quali Sindrome sciatica (Ischialgia), Nevralgia del trigemino, Nevralgia intercostale; Lesioni quali Paralisi e paresi, Sindrome di Horner. Infezioni di nervi quali poliomielite; herpes zoster, Disturbi sensoriali quali Disturbi quantitativi, Disturbi qualitativi (disestesia), Disturbi dissociativi; Disturbi del sistema nervoso in generale quali Irrequietezza e insonnia, Distonia vegetativa, Neurastenia, Stati depressivi, Esaurimenti nervosi, Cefalea; Neuropatie quali Mononeuropatie, Mononeuropatie multiple, Polineuropatie, Disturbi nervosi quali Afasia, Amnesia, Agnosia, Aprassia, Dislessia, Esiti di ictus o di embolia gassosa o di emorragia cerebrale, Patologie dell'apparato uditivo quali Acufeni, Presbiacusia, Ipoacusia neurosensoriale improvvisa, Ipoacusia neurosensoriale progressiva, Riduzione o perdita dell'olfatto, Patologie dell'apparato visivo quali malattie della cornea e della sclera (cheratiti, distrofie, scleriti, episcleriti, etc.), glaucoma, malattie della retina (patologia vascolare, retinopatie diabetiche, degenerazione maculare), malattie della coroide (coroiditi, tumori, etc.); malattie del nervo ottico (neuriti, otticopatie, etc.); Patologie cutanee quali eritema solare, dermatite atopica, linfoma cutaneo a cellule T, carcinoma spinocellulare, sclerodermia, lesioni iperproliferative paraneoplastiche, psoriasi, Perdita dei capelli, Per aumentare l'attività

intellettiva; Protezione dall'invecchiamento cerebrale e dalla riduzione dell'efficienza delle funzioni cerebrali

Uno stimolo della produzione endogena di Serotonina può essere di ausilio per dare un effetto euforizzante, per la cura della depressione e delle malattie depressive e delle nevrosi ossessive, per la cura dell'ansietà, per la cura dello stress, per la cura della timidezza, per il controllo dell'appetito e del comportamento alimentare, per accelerare la comparsa del senso di sazietà e in generale la riduzione del cibo ingerito, per la cura dell'obesità, per stimolare la riduzione dell'assunzione dei carboidrati e degli zuccheri, per la terapia e prevenzione del diabete, per la terapia dell'emicrania, per il controllo della eiaculazione precoce, per la cura dell'insonnia e per migliorare la qualità e la quantità del sonno.

Uno stimolo della produzione endogena di Sostanza P può essere di ausilio per uso per la riduzione della pressione sanguigna, per la cura delle anemie attraverso la stimolazione dell'ematopoiesi, per ridurre il dolore, per prevenire o ridurre la cefalea.

Prodotto secondo la rivendicazione 8 per la stimolazione della produzione endogena di Eparina per uso: per esercitare azione anticoagulante; Per agire come fluidificante del sangue, in specie nei pazienti che hanno una maggiore coagulabilità del sangue o con fattori di rischio quali fibrillazione atriale, trombosi venosa profonda, soggetti in dialisi, per prevenire la formazione di trombi ed il rischio di complicanze anche mortali quali la trombosi polmonare o l'infarto cardiaco; Per la prevenzione della formazione di trombi in pazienti operati di chirurgia cardiaca o per posizionamento di stent coronarici.

Uno stimolo della produzione endogena di ECF-A viene utilizzato allo scopo di agire da solo od in combinazione per potenziare la difesa antibatterica e antivirale contro le infezioni e facilitare l'azione della immunità cellulare.

25

BIBLIOGRAFIA

1) Megan H. Cortazzo, Edmund S. Kassis, Kari A. Sproul, and Nina Felice Schor Nerve Growth Factor (NGF)-Mediated Protection of Neural Crest Cells from Antimitotic Agent-Induced Apoptosis: The Role of the Low-Affinity NGF Receptor . Volume 16, Number 12, Issue of June 15, 1996 pp. 3895-3899

30

- 2) Chen XQ, Fawcett JR, Rahman YE, Ala TA, Frey II WH. Delivery of Nerve Growth Factor to the Brain via the Olfactory Pathway. *J Alzheimers Dis* 1998 Mar;1(1):35-44.
- 3) Tuveri M, Generini S, MAtucci Cerinic M, Aloe L: . NGF, a useful tool in the treatment of chronic vasculitic ulcers in rheumatoid arthritis. *The Lancet*, Volume 356, Issue 9243, Pages 1739 - 1740, 18 November 2000
- 4) Bonini St., Lambiase A, Rama P, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology* 2000;107:1347–52.
- 5) Lambiase A, Bonini St., Rama P, Bonini Se., Aloe L. Anti-inflammatory and healing activities of nerve growth factor in immune corneal ulcers with stromal melting. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1446–9.
- 6) Lambiase A, Rama P, Aloe L, Bonini S. Management of neurotrophic keratopathy. *Curr Opin Ophthalmol* 1999;10:270–6.
7. Bonini S, Rama P, Olzi D, Lambiase A. Neurotrophic keratitis. *Eye*. 2003 Nov;17(8):989-95
- 8) Lambiase A, Mantelli F, Bonini S.: Nerve growth factor eye drops to treat glaucoma. *Drugs News Perspect* 2010 Jul-Aug;23(6):361-7.
- 9) Williams BJ, Eriksdotter-Jonhagen M, Granholm AC. *Prog Neurobiol*. Nerve growth factor in treatment and pathogenesis of Alzheimer's disease. 2006 Oct;80(3):114-28. Epub 2006 Nov 2.
- 10) Bonini S, Lambiase A, Bonini S, Levi-Schaffer F, Aloe L. Nerve growth factor: an important molecule in allergic inflammation and tissue remodeling. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118, 159-162
- 11) Stone EA. Method of using alpha 2-antagonists for the treatment of neurogenerative diseases. USP: 5,281,607, Jan 25, 1994.
- 12). Lerner EN. Administering pharmaceuticals to the mammalian central nervous system. USP 6,420,046 B1. June 25, 2002
- 13) Di Mauro T, Holy C, Attawis M, Lillienfeld S, Kapur T, Binette F. Intranasal delivery of clenbuterol across the cribriform plate and into the brain. Patent Application Publication: Pub. No. US 2008/0014152

- 14) Di Mauro T. Methods of delivering therapeutics to the brain. PCT/US Application Number; 2006/030769
- 15) Cox M, Nelson D. Lehninger, Principles of Biochemistry, Freeman, 1100, ISBN0-7167-4339-6, 2004
- 5 16) Caroleo MC, Costa N, Tirassa P, Aloe L: Nerve growth factor produced by activated human monocytes/macrophages is severely affected by ethanol. Alcohol Oct-Nov, 34 (2-3): 107-14, 2004.
- 17). Yuan et al.: "A Sleep-Promoting Role for the Drosophila Serotonin Receptor 1A." Current Biology 16, 1051-1062, June 6, 10, 2006.
- 10 18) Yuan Q, Fangju L, Xiangzhong Z, Amita S. Serotonin modulates circadian entrainment in drosophila. Neuron, volume 47, issue 1, 115-127, july 7, 2005
- 19). Supowit S.C, Ethridge R.T, Zhao H, Katki K.A, DiPette D.J. Calcitonine gene-related peptide and substance P contribute to reduced blood pressure in sympathectomized rats. American Journal of Phisiology. Heart and Circulatory
- 15 Phisiology.Vol. 289, no. 3, September 2005
- 20). In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. Rameshwar P, Ganea D, Gascon P. Blood, Jan 15, vol 81 (2), pp. 391-398, 1993.
- 21). Clark JW, Solomon GD, Senanayake PD, Gallagher C.Substance P concentration and history of headache in relation to postlumbar puncture headache: towards
- 20 prevention. J Neurol Neurosurg Psychiatry 60: 681-683, 1996.
- 22) Matsuda H, Kawakita K, Kiso Y, Nakano T, Kitamura Y. Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. Journal of Immunology vol 142, issue 3, 927-931, 1989.
- 23). Severini C, Improta G, Erspamer GF, Salvadori S, Erspamer V: The tachichinine
- 25 peptide family. Pharmacol Rev, June 54(2): 285-322, 2002
- 24). Reid IA. Polypeptides, Substance P. In Bertram G. Katzum (ed). Basic & Clinical Pharmacology, 5th ed, London etc; Appleton& Lange, 259-261, 1992.
- 25). Lazarczyk M, Matya E, Lipkowsky A. Substance P and its receptors- a potential target for novel medicines in malignant brain tumor therapies (mini-review). Folia
- 30 Neuropathol. 45(3): 99-107, 2007

- 26) Linhardt RJ, Gunay NS. Production and Chemical Processing of low molecular weight heparins. *Sem. Thromb Hem*: 3; 5-16, 1999
- 27) Shi H: Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 76 (3): 520-7, 2004
- 5 28) Owhashi M et al: Importance of mast-cells derived eosinophil chemotactic factor A on granuloma formation in murine Schistosomiasis japonica: evaluation using mast-cell deficient w/w mice. *Allergy and Immunology*. Vol. 92, No. 1, 1990
- 29) Nicol GD, Klingberf DK, Vasko MR: Prostaglandin E2 increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, vol 12, 1917-1927, 1992
- 10 30) Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG; Leucocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and a platelet-activating factor. *J.Exp.Med*- 136 (6): 1356-77, 1972
- 31) Skaper SD, Pollock M, Facci L. Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins. *Brain Res Mol Brain Res*. Dec 30, 97(2): 177-85, 2001
- 15 32) Prussin C, Metcalfe DD: IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 111 (2 Suppl): 486-494, 2003.
- 33) Pulendran B, Ono SJ: A shot in the arm for mast cells. *Nat. Med.* 14 (5): 489-90, 2008.
- 20 34) Denburg Judah A: Allergy and allergic diseases: the new mechanism and therapeutics. Totowa NJ. Humana Press. ISBN 0-89603-404-6.
- 35) Leon T, Buiani A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L, Levi Montalcini R. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc. Nati. Acad.Sci. USA*. Vol. 91, pp. 3739-3743, April 1994.
- 25 36) American College of Physician: Normal Laboratory values. *Acpinternist.org*, pag, 1, July 1, 2008.
- 37) McLean KA, O'Neill P.A., Davies I, Morris J: Influence of age on Plasma Osmolality, A community study. *Age-Ageing* 21, (1), 56-60, 1992.

- 38) Quarcoo D, Fischer T, Peckenschneider, Groneberg D, Welker P: High abundances of neurotrophin 3 in atopic dermatitis mast cell. *Journal of occupational medicine and toxicology* 10: 1186/1745-6673-4-8, 2009
- 39) h. Engelberg H, Dudley A. Plasma Heparin Levels in Normal Man. *Circulation* 5 1961;23:578-581
- 40) Czarnetzki BM, Kalveram KJ, Dierksmeier U: Serum eosinophil chemotactic levels in patients with bullous pemphigoid, drug reactions and atopic eczema. *The journal of investigative dermatology*. 73, 163-165, 1979.
- 41) Li Y, Nishimura T, Teruya K, Maki T, et al- Protective mechanism of reduced water 10 against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage: Scavenging effect against reactive oxygen species. *Cytotechnology*, Vol. 40, numbers 1-3, pp. 139-149 (11). Pub. Springer.

Rivendicazioni

1. Prodotto comprendente un agente a osmolalità minore, uguale o maggiore fino al 30% di quella del sangue, per applicazione sulla mucosa del naso e dei seni paranasali per la stimolazione della produzione di NGF e/o mediatori dell'infiammazione (IM) endogeni attraverso una irritazione, per uso nella terapia e prevenzione delle patologie del sistema nervoso negli esseri umani e/o negli animali.
2. Prodotto secondo la rivendicazione 1, in cui detto agente presenta osmolalità minore o uguale a quella del sangue.
- 10 3. Prodotto secondo le rivendicazioni 1 o 2, in cui detta applicazione di detto agente presenta le seguenti caratteristiche: quantità di ogni erogazione da 0,2 gr/sec a 30 gr/sec, tempo di ogni erogazione da 0,1 secondi a 2500 secondi, frequenza da 1 a 34 volte al dì
4. Prodotto secondo la rivendicazione 3 applicato con una quantità di ogni erogazione da 5 g/sec a 15 g/sec, un tempo di ogni erogazione da 0,4 a 6 secondi per una frequenza da 1 a 10 volte al dì.
- 15 5. Prodotto secondo almeno una delle rivendicazioni precedenti, in cui detto agente è scelto dalla classe formata da Acqua distillata o Bidistillata, Acqua, Soluzione fisiologica (con NaCl da 0.9% a 0,01% con o senza aggiunta di Glucosio), Ringer, Ringer lattato, Soluzione di Hartmann, soluzione Sulfurea (in acqua o acqua distillata con quantità da 0.1 mg a 10 mg di H₂S acido solfidrico per litro), Acqua alcalina ionizzata (AIW) (di PH compreso tra 8 e 11), Acqua deionizzata e loro combinazioni.
- 20 6. Prodotto secondo almeno una delle rivendicazioni precedenti per stimolazione di NGF endogeno per uso in un trattamento di prevenzione e terapia delle patologie del sistema nervoso centrale o periferico, delle patologie dell'apparato uditivo o visivo, della perdita dell'olfatto o dei capelli o per aumentare l'efficienza del sistema nervoso e stimolare una maggiore acutezza mentale.
- 25 7. Prodotto secondo la rivendicazione 6, in cui dette malattie degenerative del Sistema nervoso centrale appartengono alla classe formata da Sclerosi multipla,
- 30

- Sindrome di Parkinson, Apoplessia (Ictus), Paralisi progressiva, Tabes dorsalis, Morbo di Alzheimer, Meningoencefalite virale, Meningite batterica, Malattie del sistema nervoso periferico, Malattie di nervi periferici; Nevralgie quali Sindrome sciatica (Ischialgia), Nevralgia del trigemino, Nevralgia intercostale; Lesioni quali
- 5 Paralisi e paresi, sindrome di Horner, Infezioni di nervi quali poliomielite; herpes zoster, Disturbi sensoriali quali Disturbi quantitativi, Disturbi qualitativi (disestesia), Disturbi dissociativi; Disturbi del sistema nervoso in generale quali Irrequietezza e insonnia, Distonia vegetativa, Neurastenia, Stati depressivi, Esaurimenti nervosi, Cefalea; Neuropatie quali Mononeuropatie, Mononeuropatie multiple,
- 10 Polineuropatie, Disturbi nervosi quali Afasia, Amnesia, Agnosia, Aprassia, Dislessia, Esiti di ictus o di embolia gassosa o di emorragia cerebrale, Patologie dell'apparato uditivo quali Acufeni, Presbiacusia, Ipoacusia neurosensoriale improvvisa, Ipoacusia neurosensoriale progressiva, Riduzione o perdita dell'olfatto, Patologie dell'apparato visivo quali malattie della cornea e della sclera (cheratiti,
- 15 distrofie, scleriti, episcleriti, etc.), glaucoma, malattie della retina (patologia vascolare, retinopatie diabetiche, degenerazione maculare), malattie della coroide (coroiditi, tumori, etc.); malattie del nervo ottico (neuriti, otticopatie, etc.); Patologie cutanee quali eritema solare, dermatite atopica, linfoma cutaneo a cellule T, carcinoma spinocellulare, sclerodermia, lesioni iperproliferative paraneoplastiche, psoriasi,
- 20 Perdita dei capelli, Per aumentare l'attività intellettuale; Protezione dall'invecchiamento cerebrale e dalla riduzione dell'efficienza delle funzioni cerebrali.
8. Prodotto secondo almeno una delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui detti IM appartengono alla classe formata dai seguenti composti Neurotrofina 3 (NT3),
- 25 Neurotrofina 4 (NT4), Serotonina, Sostanza P, Eparina, Fattore di chemiotassi degli eosinofili (Eosinophil chemotactic factor ECF-A).
9. Prodotto secondo la rivendicazione 8 per la stimolazione della produzione endogena di NT3 e NT4 per uso nella prevenzione e terapia delle patologie del sistema nervoso centrale o periferico, delle patologie dell'apparato uditivo o visivo,
- 30 della perdita dell'olfatto o dei capelli o per aumentare l'efficienza del sistema

- nervoso e stimolare una maggiore acutezza mentale. Per la prevenzione e terapia di malattie degenerative del Sistema nervoso centrale quali Sclerosi multipla, Sindrome di Parkinson, Apoplessia (Ictus), Paralisi progressiva, Tabes dorsalis, Morbo di Alzheimer, Meningoencefalite virale, Meningite batterica, Malattie del sistema nervoso periferico, Malattie di nervi periferici; Nevralgie quali Sindrome sciatica (Ischialgia), Nevralgia del trigemino, Nevralgia intercostale; Lesioni quali Paralisi e paresi, Sindrome di Horner. Infezioni di nervi quali poliomielite; herpes zoster, Disturbi sensoriali quali Disturbi quantitativi, Disturbi qualitativi (disestesia), Disturbi dissociativi; Disturbi del sistema nervoso in generale quali Irrequietezza e insonnia, Distonia vegetativa, Neurastenia, Stati depressivi, Esaurimenti nervosi, Cefalea; Neuropatie quali Mononeuropatie, Mononeuropatie multiple, Polineuropatie, Disturbi nervosi quali Afasia, Amnesia, Agnosia, Aprassia, Dislessia, Esiti di ictus o di embolia gassosa o di emorragia cerebrale, Patologie dell'apparato uditivo quali Acufeni, Presbiacusia, Ipoacusia neurosensoriale improvvisa, Ipoacusia neurosensoriale progressiva, Riduzione o perdita dell'olfatto, Patologie dell'apparato visivo quali malattie della cornea e della sclera (cheratiti, distrofie, scleriti, episcleriti, etc.), glaucoma, malattie della retina (patologia vascolare, retinopatie diabetiche, degenerazione maculare), malattie della coroide (coroiditi, tumori, etc.); malattie del nervo ottico (neuriti, otticopatie, etc.); Patologie cutanee quali eritema solare, dermatite atopica, linfoma cutaneo a cellule T, carcinoma spinocellulare, sclerodermia, lesioni iperproliferative paraneoplastiche, psoriasi, Perdita dei capelli, Per aumentare l'attività intellettuale; Protezione dall'invecchiamento cerebrale e dalla riduzione dell'efficienza delle funzioni cerebrali
10. Prodotto secondo la rivendicazione 8 per la stimolazione della produzione endogena di Serotonina per uso per dare un effetto euforizzante, per la cura della depressione e delle malattie depressive e delle nevrosi ossessive, per la cura dell'ansietà, per la cura dello stress, per la cura della timidezza, per il controllo dell'appetito e del comportamento alimentare, per accelerare la comparsa del senso di sazietà e in generale la riduzione del cibo ingerito, per la cura dell'obesità,

per stimolare la riduzione dell'assunzione dei carboidrati e degli zuccheri, per la terapia e prevenzione del diabete, per la terapia dell'emicrania, per il controllo della eiaculazione precoce, per la cura dell'insonnia e per migliorare la qualità e la quantità del sonno.

- 5 11. Prodotto secondo la rivendicazione 8 per la stimolazione della produzione endogena di Sostanza P per uso per la riduzione della pressione sanguigna, per la cura delle anemie attraverso la stimolazione dell'ematopoiesi, per ridurre il dolore, per prevenire o ridurre la cefalea.
- 10 12. Prodotto secondo la rivendicazione 8 per la stimolazione della produzione endogena di Eparina per uso: per esercitare azione anticoagulante; Per agire come fluidificante del sangue, in specie nei pazienti che hanno una maggiore coagulabilità del sangue o con fattori di rischio quali fibrillazione atriale, trombosi venosa profonda, soggetti in dialisi, per prevenire la formazione di trombi ed il rischio di complicanze anche mortali quali la trombosi polmonare o l'infarto
- 15 cardiaco. Agisce anche per la prevenzione della formazione di trombi in pazienti operati di chirurgia cardiaca o per posizionamento di stent coronarici.
- 20 13. Prodotto secondo la rivendicazione 8 per uso in un trattamento di stimolazione della produzione endogena di fattore di chemiotassi degli eosinofili (Eosinophil chemotactic factor ECF-A) viene utilizzato allo scopo di agire da solo od in combinazione per potenziare la difesa antibatterica e antivirale contro le infezioni e facilitare l'azione della immunità cellulare.
14. Prodotto secondo almeno una delle rivendicazioni precedenti in cui detta applicazione avviene per mezzo di un erogatore.
- 25 15. Prodotto comprendente un agente a osmolalità minore, uguale o maggiore fino al 30% di quella del sangue, per applicazione sulla mucosa del naso e dei seni paranasali per la stimolazione della produzione di NGF e/o IM endogeni attraverso una irritazione, come adiuvante negli stati patologici derivanti dalla degenerazione delle cellule nervose in esseri umani e animali in combinazione con altri agenti terapeutici.

- 16 Prodotto secondo la rivendicazione 15, in cui detto agente presenta osmolalità minore o uguale a quella del sangue.
- 17 Prodotto secondo le rivendicazioni da 15 a 16, in cui detta applicazione di detto agente presenta le seguenti caratteristiche: quantità di ogni erogazione da 0,2 gr/sec a 30 gr/sec, tempo di ogni erogazione da 0,1 secondi a 2500 secondi, frequenza da 1 a 34 volte al dì
- 18 Prodotto secondo almeno una delle rivendicazioni da 15 o 16, in cui detto agente è scelto dalla classe formata da Acqua distillata o Bidistillata, Acqua, Soluzione fisiologica (con NaCl da 0.9% a 0,01% con o senza aggiunta di Glucosio), Ringer, Ringer lattato, Soluzione di Hartmann, soluzione Sulfurea (in acqua o acqua distillata con quantità da 0.1 mg a 10 mg di H₂S acido solfidrico per litro), Acqua alcalina ionizzata (AIW) (di PH compreso tra 8 e 11), Acqua deionizzata e loro combinazioni.

Claims

1. A product comprising an agent of osmolality lower, equal or higher of up to 30% than blood osmolality, for application on the nasal and paranasal mucosa to stimulate the endogenous production of NGF and/or inflammatory mediators (IM), through an irritation, for use in the therapy and prevention of nervous system pathologies in human beings and/or animals.
2. The product according to claim 1, wherein said agent has an osmolality lower or equal than blood osmolality.
3. The product according to claims 1 or 2, wherein said application of said agent has the following characteristics: quantity delivered at each application from 0,2 g/sec to 30 g/sec, time of each application from 0,1 sec to 2500 sec, application frequency from 1 to 34 times a day.
4. The product according to claim 3, wherein the quantity delivered at each application is from 5 g/sec to 15 g/sec, the time of each application from 0,4 sec to 6 sec, the application frequency from 1 to 10 times a day.
5. The product according to at least one of the previous claims, wherein said agent is selected from the group consisting of Distilled water, Bidistilled water (distilled twice water), Water, Physiologic solution (with NaCl from 0,9% to 0,01% with or without added glucose), Ringer, lactated Ringer, Hartmann solution, Sulphuric solution (in water or distilled water with a quantity of sulphuric acid H₂S from 0.1 mg to 10 mg per liter). Alkaline ionized water (AIW) (PH between 8 and 11), Deionized water and their combinations.
6. The product according to at least one of the previous claims to stimulate the production of endogenous NGF useful in the therapy and prevention of pathologies of the central and peripheral nervous system, of the auditory and visual system, of the loss of olfaction, of the loss of hair; useful also to increase efficiency of the nervous system and to stimulate a greater mental sharpness.
7. The product according to claim 6, wherein said degenerative diseases of the central nervous system belong to the group consisting of Multiple sclerosis,

- Parkinson's disease, Stroke, Progressive Palsy, Tabes dorsalis, Alzheimer's disease, viral Meningoencephalitis, Bacterial Meningitis, Peripheral nervous system diseases, Peripheral nerves diseases, Neuralgias as Sciatic syndrome, Trigeminal Neuralgia, Intercostal neuralgia, Lesions as Palsy or Paresis, Horner syndrome, Infection of nerves as Poliomyelitis, Herpes Zoster, Sensorial disorders as Quantitative disorders, Qualitative disorders (disesthesia), Dissociative disorders, disorders of Nervous system in general, as restlessness and insomnia, Neurovegetative dystonia, Neurasthenia, Depressive disorders, Nervous breakdown, Migraine, Neuropathies as Mononeuropaties, Multiple Mononeuropaties, Multiple Polyneuropathies, Nervous system as Aphasia, Amnesia, Agnosia, Apraxia, Dyslexia, Stroke damages, Decompression sickness damages, Cerebral hemorrhage damages, Pathologies of the auditory system such as Tinnitus, Presbycusis, Sudden sensory-neural hearing loss, Progressive sensory-neural hearing loss, Reduction or loss of sense of smell, Pathologies of the visual system such as Corneal diseases, Scleral diseases (Keratitis, Dystrophy, Scleritis, Episcleritis, et cetera), Glaucoma, Retinal diseases (vascular pathology, diabetic retinopathy, Macular degeneration), Choroid diseases (Choroiditis, Tumors et cetera), Optic nerve diseases (neuritis, opticopathies et cetera); Cutaneous pathologies such as Solar Erythema, atopic dermatitis, Cutaneous T cell Lymphoma. Spinocellular carcinoma, Scleroderma, Hyperproliferative paraneoplastic disorders, Psoriasis, Hair loss, to increase Mental sharpness, to prevent Mental ageing and to prevent the reduction of Mental efficiency.
8. The product according to at least one of the previous claims from 1 to 5, wherein such inflammatory mediators belong to the group consisting of Neurotrophin 3 (NT3), Neurotrophin 4 (NT4), Serotonin, Substance P, Heparin, Eosinophil Chemotactic Factor (ECF-A).
 9. The product according to claim 8 to stimulate the endogenous production of NT3 and NT4 useful in the therapy and prevention of pathologies of the central nervous system and peripheral nervous system, of the auditory and visual

- system, of the loss of olfaction, of the loss of hair; to increase the efficiency of the nervous system and to stimulate a greater mental sharpness; useful also for the prevention and therapy of degenerative diseases of central nervous system which belong to the group consisting of Multiple sclerosis, Parkinson's disease, Stroke, Progressive Palsy, Tabes dorsalis, Alzheimer's disease, viral
- 5 Meningoencephalitis, Bacterial Meningitis, Peripheral nervous system diseases, Peripheral nerves diseases, Neuralgias as Sciatic syndrome, Trigeminal Neuralgia, Intercostal neuralgia, Lesions as Palsy or Paresis, Horner syndrome, Infection of nerves as Poliomyelitis, Herpes Zoster, Sensorial disorders as
- 10 Quantitative disorders, Qualitative disorders (disesthesia), Dissociative disorders, disorders of Nervous system in general, as restlessness and insomnia, Neurovegetative dystonia, Neurasthenia, Depressive disorders, Nervous breakdown, Migraine, Neuropathies as Mononeuropaties, Multiple Mononeuropaties, Multiple Polyneuropathies, Nervous system as Aphasia,
- 15 Amnesia, Agnosia, Apraxia, Dyslexia, Stroke damages, Decompression sickness damages, Cerebral hemorrhage damages, Pathologies of the auditory system such as Tinnitus, Presbycusis, Sudden sensory-neural hearing loss, Progressive sensory-neural hearing loss, Reduction or loss of sense of smell, Pathologies of the visual system such as Corneal diseases, Scleral diseases
- 20 (Keratitis, Dystrophy, Scleritis, Episcleritis, et cetera), Glaucoma, Retinal diseases (vascular pathology, diabetic retinopathy, Macular degeneration), Choroid diseases (Choroiditis, Tumors et cetera), Optic nerve diseases (neuritis, opticopathies et cetera); Cutaneous pathologies such as Solar Erythema, atopic dermatitis, Cutaneous T cell Lymphoma. Spinocellular
- 25 carcinoma, Scleroderma, Hyperproliferative paraneoplastic disorders, Psoriasis, Hair loss, to increase Mental sharpness, to prevent Mental ageing and to prevent the reduction of Mental efficiency.
- 10 The product according to claim 8 to stimulate the production of endogenous Serotonin useful to create a sense of happiness, to treat depression,
- 30 depressive disorders and obsessive neurosis, to treat anxiety, stress, shyness,

to control appetite and alimentary behavior, to fasten the appearance of a feeling of satiety and in general to reduce the amount of food eaten, to treat obesity, to stimulate the reduction of carbohydrate and sugar taking, to treat and prevent diabetes, to treat migraine, to control premature ejaculation, to
5 treat insomnia and to improve sleep quality and quantity.

11 The product according to claim 8 to stimulate the production of endogenous P Substance to reduce blood pressure, to treat anemia through stimulation of haematopoiesis, to reduce pain, and to prevent or reduce migraine symptoms.

12 The product according to claim 8 to stimulate the production of endogenous
10 Eparine, which acts to reduce blood coagulation and as a blood fluidifying agent, especially in patients with higher than normal blood coagulability or with risk factors such as atrial fibrillation, deep venous thrombosis, individuals undergoing dialysis treatment, to prevent formation of thrombi and deadly risks as pulmonary thrombosis or heart attack. It also acts to prevent the formation
15 of thrombi in patients operated by cardiac surgery or by positioning of coronary stents.

13 The product as in claim 8 to stimulate the production of endogenous Eosinophil chemotactic factor (ECF-A) to act alone or in conjunction with other agents to increase antibacterial and antiviral defense activity against infections and
20 facilitate cell-mediated immunity activity.

14 The product according to at least one of the previous claims wherein said application takes place by means of a delivery device.

15 A product containing an agent of osmolality inferior, equal or superior of up to 30% to blood osmolality for application on the nasal and paranasal mucosa to
25 stimulate through an irritation the production of NGF and/or endogenous inflammatory mediators (IM); this product is for use as adjuvant treatment in pathologic situations caused by neural cell degeneration in human and animals.

16 The product according to claim 15, wherein said agent has an osmolality minor or equal to blood osmolality.

- 17 The product according to claims 15 and 16, wherein said application has the following characteristics: quantity delivered at each application from 0,2 gr/sec to 30 gr/sec, time of each application from 0,1 sec to 2500 sec, application frequency from 1 to 34 times a day.
- 5 18 The product according to at least one of the claims 15 or 16, wherein said agent is selected from the group consisting of Distilled water, Bidistilled water (distilled twice water), Water, Physiologic solution (with NaCl from 0,9% to 0,01% with or without added glucose), Ringer, lactated Ringer, Hartmann solution, Sulphuric solution (in water or distilled water with a quantity of
- 10 sulphuric acid H₂S from 0.1 mg to 10 mg per liter). Alcaline ionized water (AIW) (PH between 8 and 11), Deionized water, and these substances used combined.

15

20

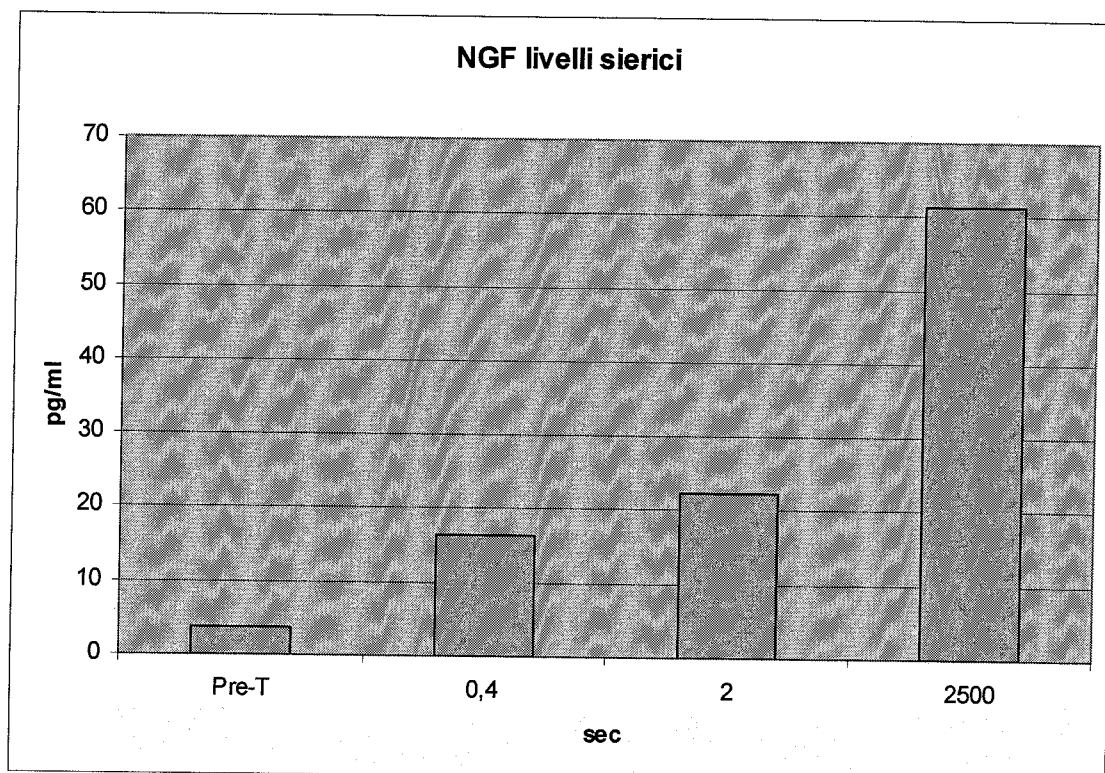


Fig. 1 Livelli sierici medi di NGF pre trattamento (n.236 soggetti) e post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg.

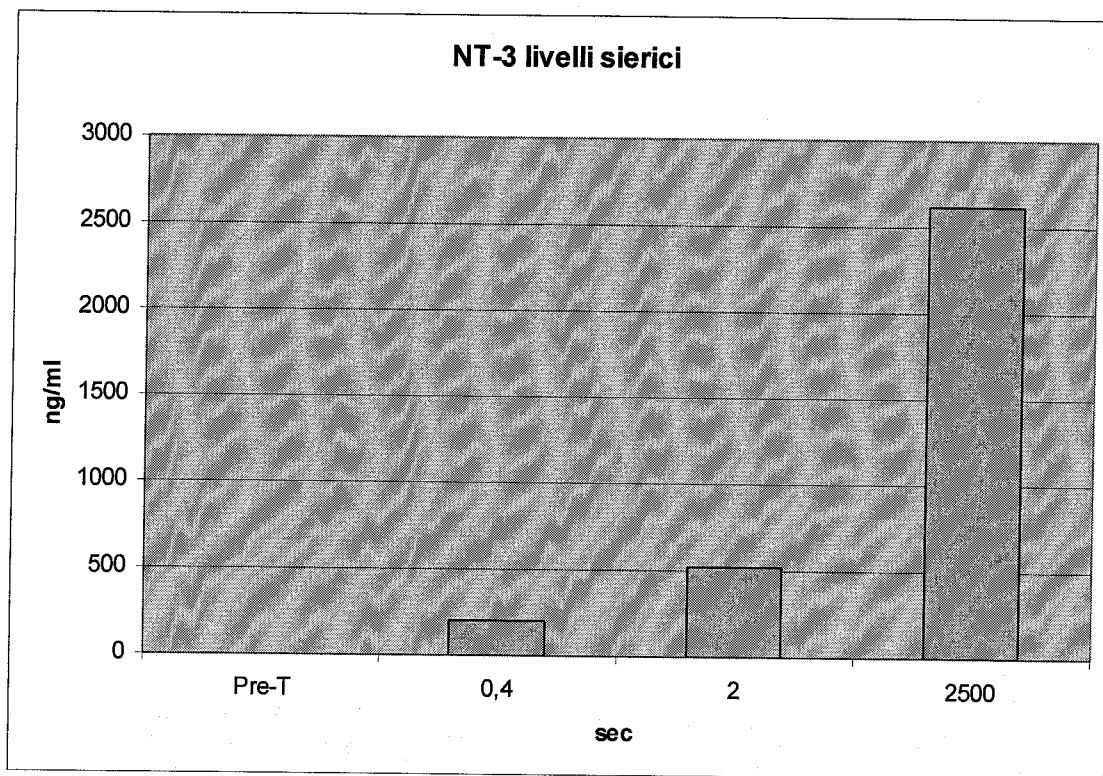


Fig. 2. Livelli sierici di NT-3 pre trattamento(n.236 soggetti) e post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg.

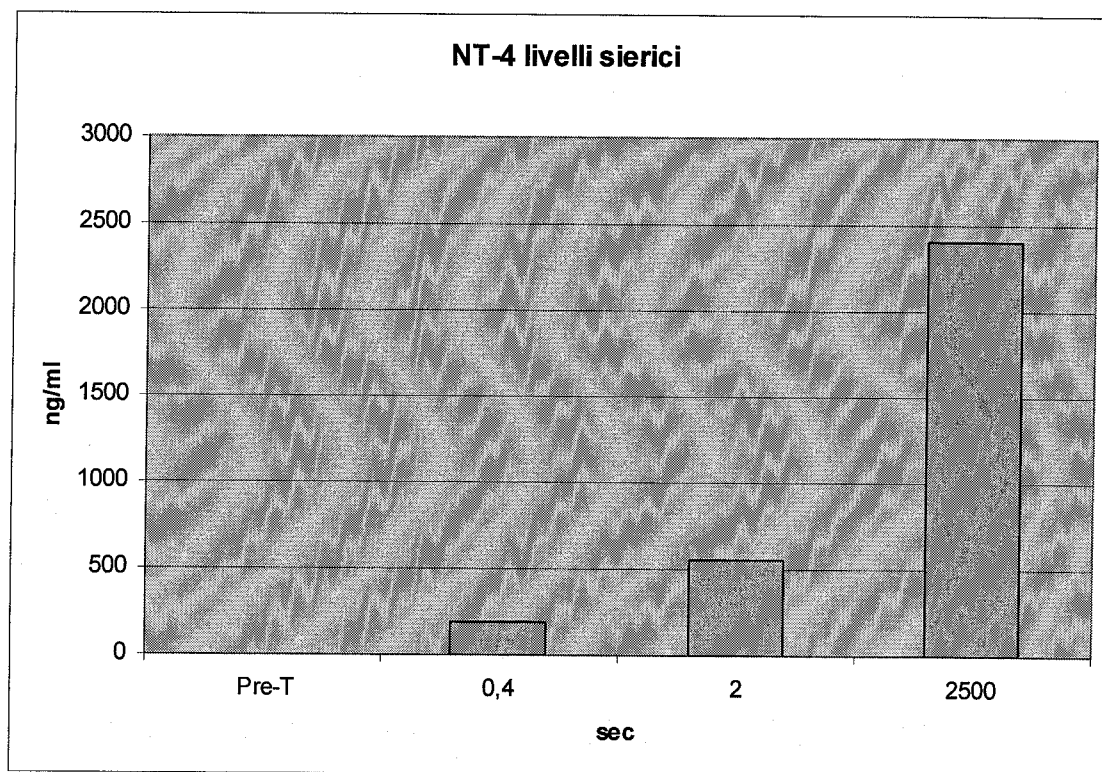


Fig. 3. Livelli sierici di NT-4 pre trattamento (n.236 soggetti) e post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg.

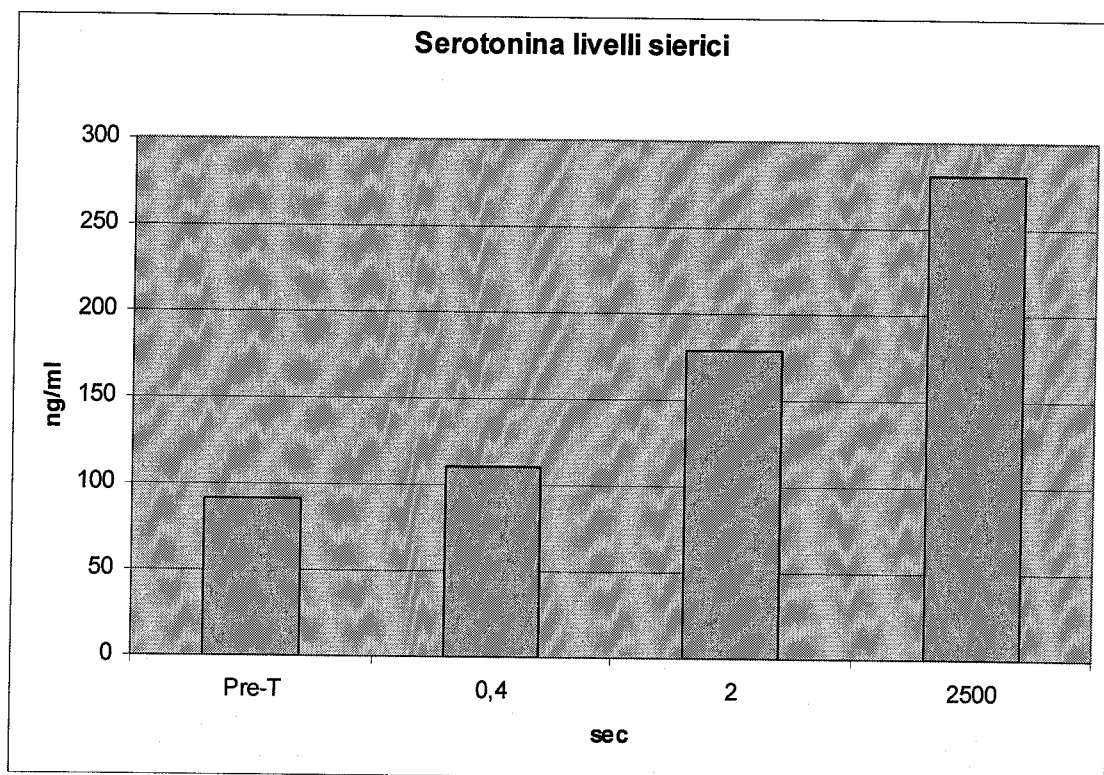


Fig. 4. Livelli sierici di Serotonina pre trattamento (n.236 soggetti) e post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg.

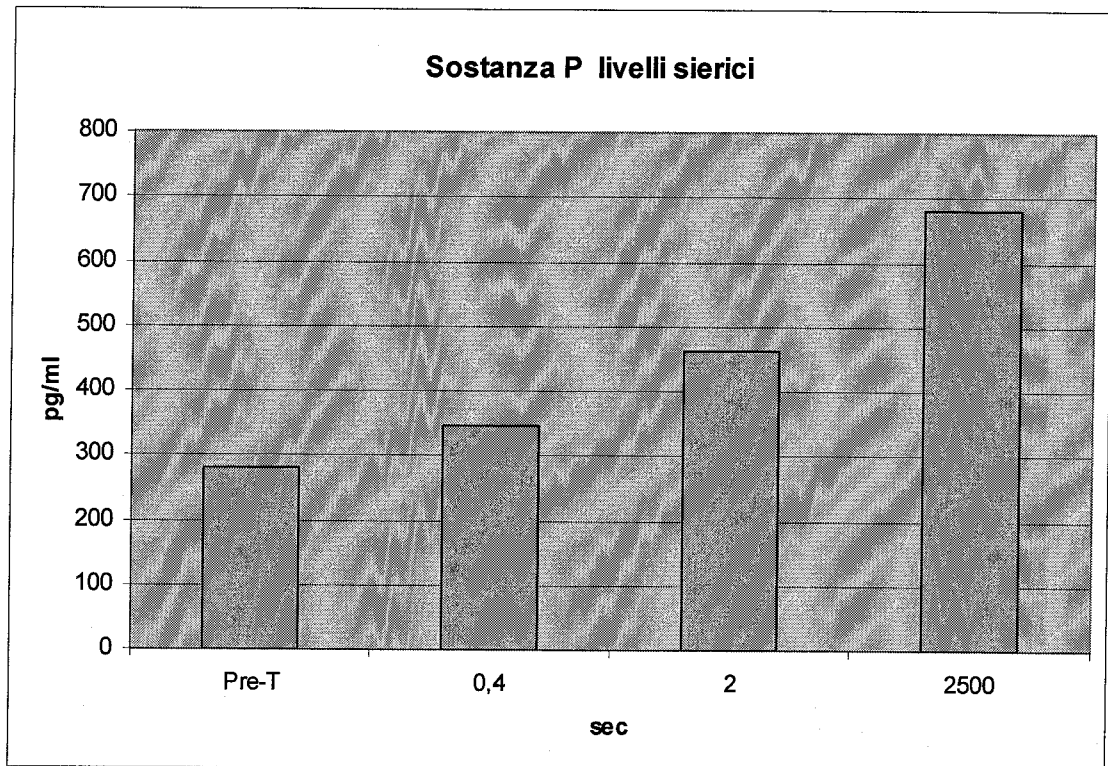


Fig. 5. Livelli sierici di Sostanza P pre trattamento (n.236 soggetti) e post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti)), Frequenza 1 volta/die per 10 gg.

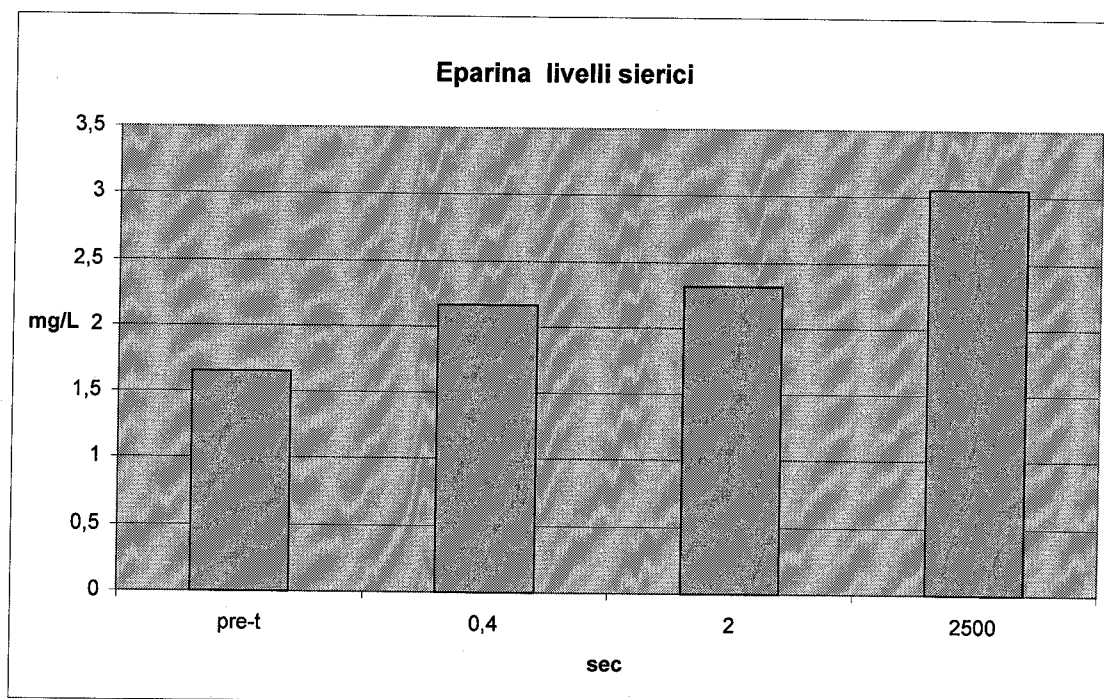


Fig. 6. Livelli sierici di Eparina pre trattamento (n.236 soggetti) e post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti)), Frequenza 1 volta/die per 10 gg.

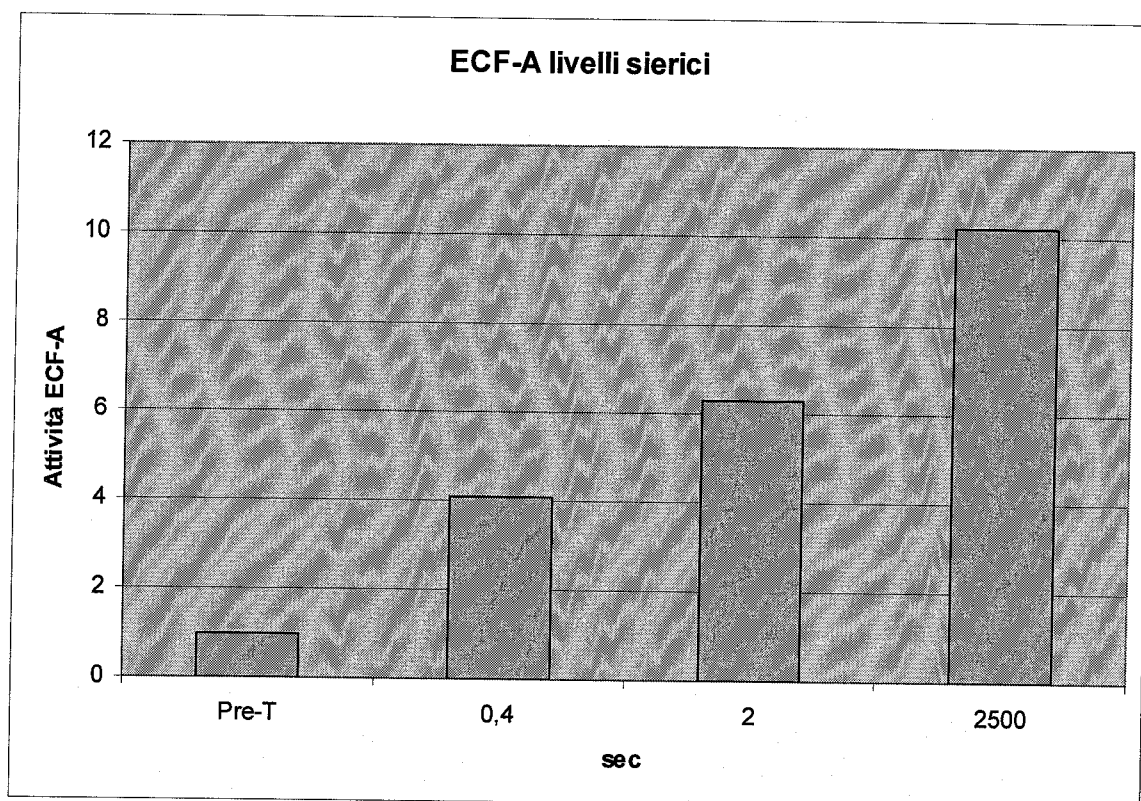


Fig. 7. Livelli sierici di ECF-A pre trattamento (n.236 soggetti) e post trattamento PEL 5 gr/sec, ET: (0.4 sec. n.4 soggetti), ET: (2 sec. n.4 soggetti), ET (2500 sec. n.4 soggetti), Frequenza 1 volta/die per 10 gg.

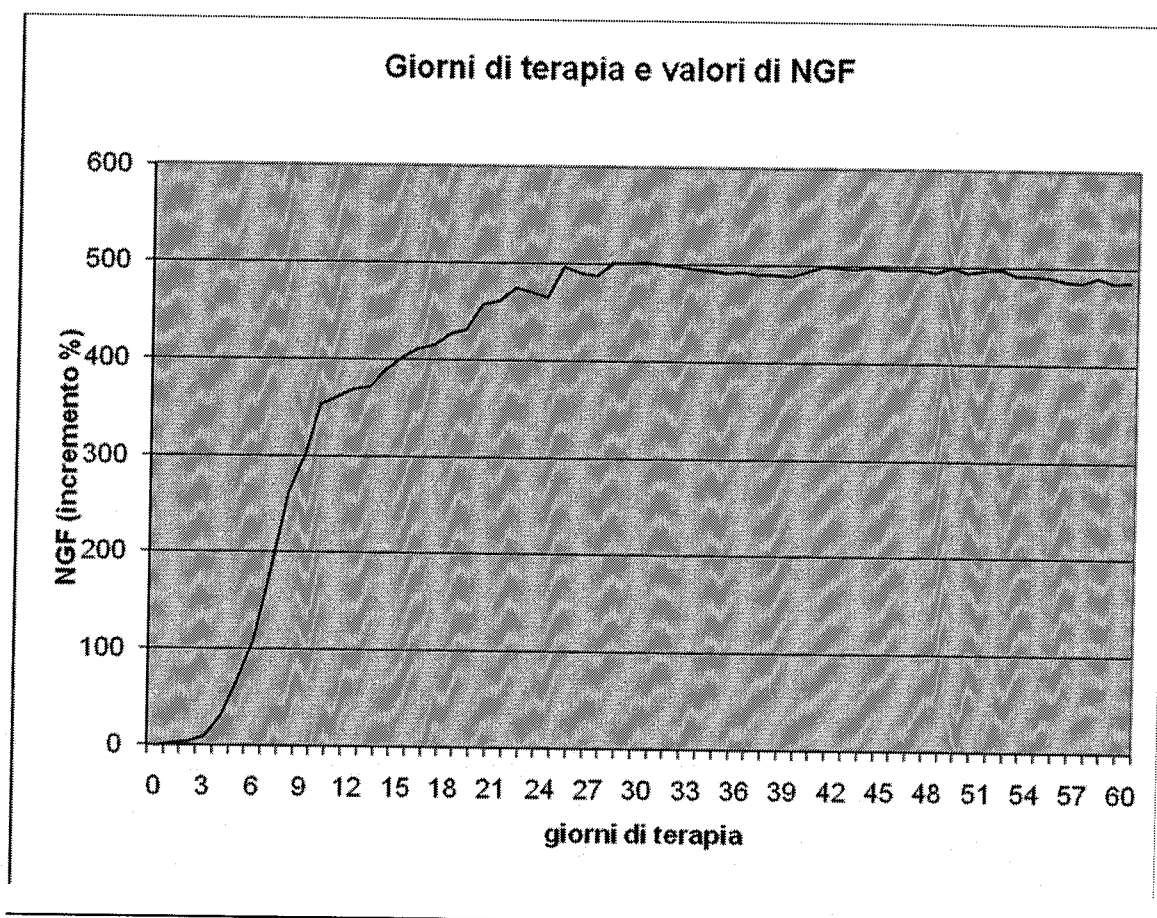


Fig. 8. Rapporto tra giorni di terapia e valori sierici di NGF (n.60 soggetti).

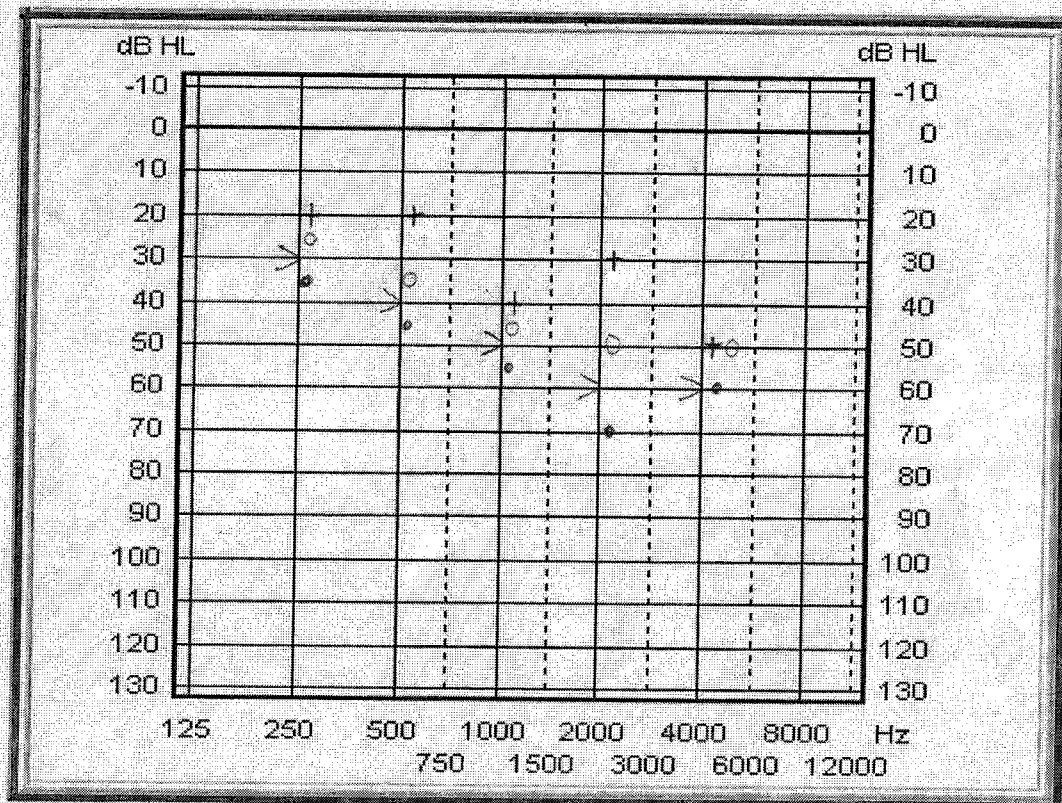


Fig. 9. Soggetti con ipoacusia neurosensoriale (n.160). Orecchio destro, audiometria ossea (AO) Terapia per 48 mesi
> Orecchio destro. Audiometria ossea pre trattamento
+ (Gruppo 1B): Terapia PEL 10 gr/sec, ET 10 sec, Frequenza 10 volte/die. AO post trattamento (n. 40)
°(Gruppo 1A): Terapia PEL 0.2 gr/sec, ET 0.2 sec, Frequenza 1 volta/die. AO post trattamento (n. 40)
• (Gruppo 2): Terapie tradizionali (n.80)

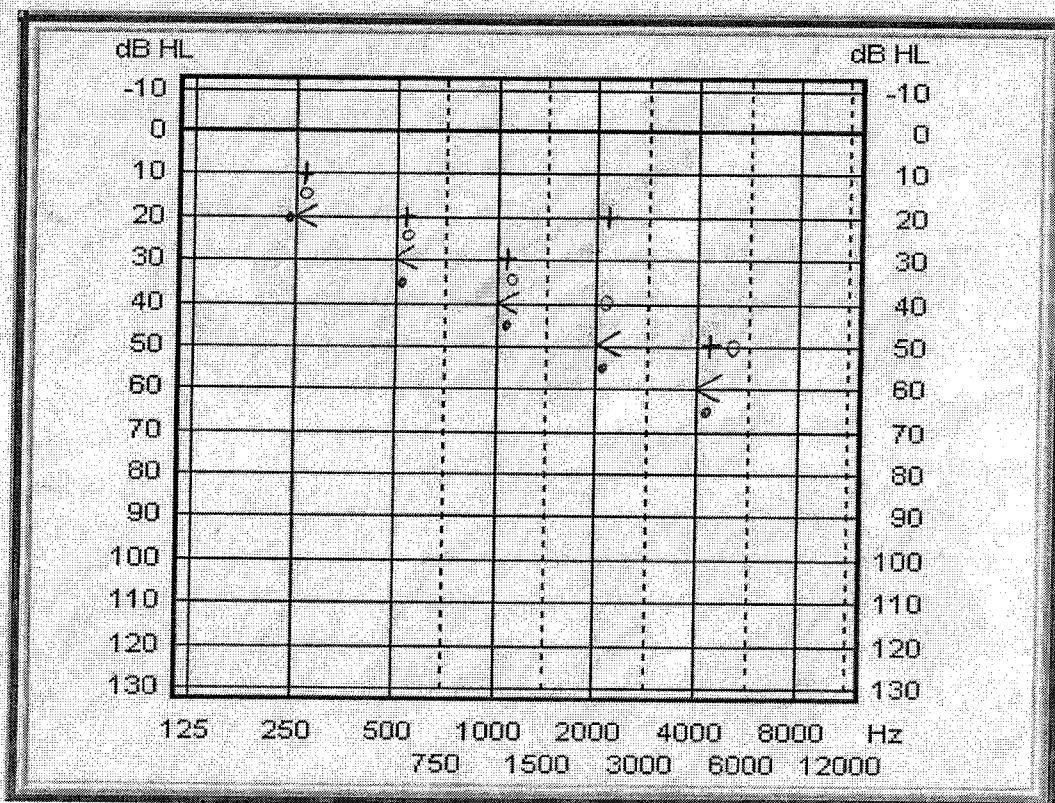


Fig. 10. Soggetti con ipoacusia neurosensoriale (n.160). Orecchio sinistro, audiometria ossea (AO) Terapia per 48 mesi
< Orecchio sinistro. Audiometria ossea pre trattamento
+ (Gruppo 1B): Terapia PEL 10 gr/sec, ET 10 sec, Frequenza 10 volte/die. AO post trattamento (n. 40)
°(Gruppo 1A): Terapia PEL 0.2 gr/sec, ET 0.2 sec, Frequenza 1 volta/die. AO post trattamento (n. 40)
• (Gruppo 2): Terapie tradizionali (n.80)

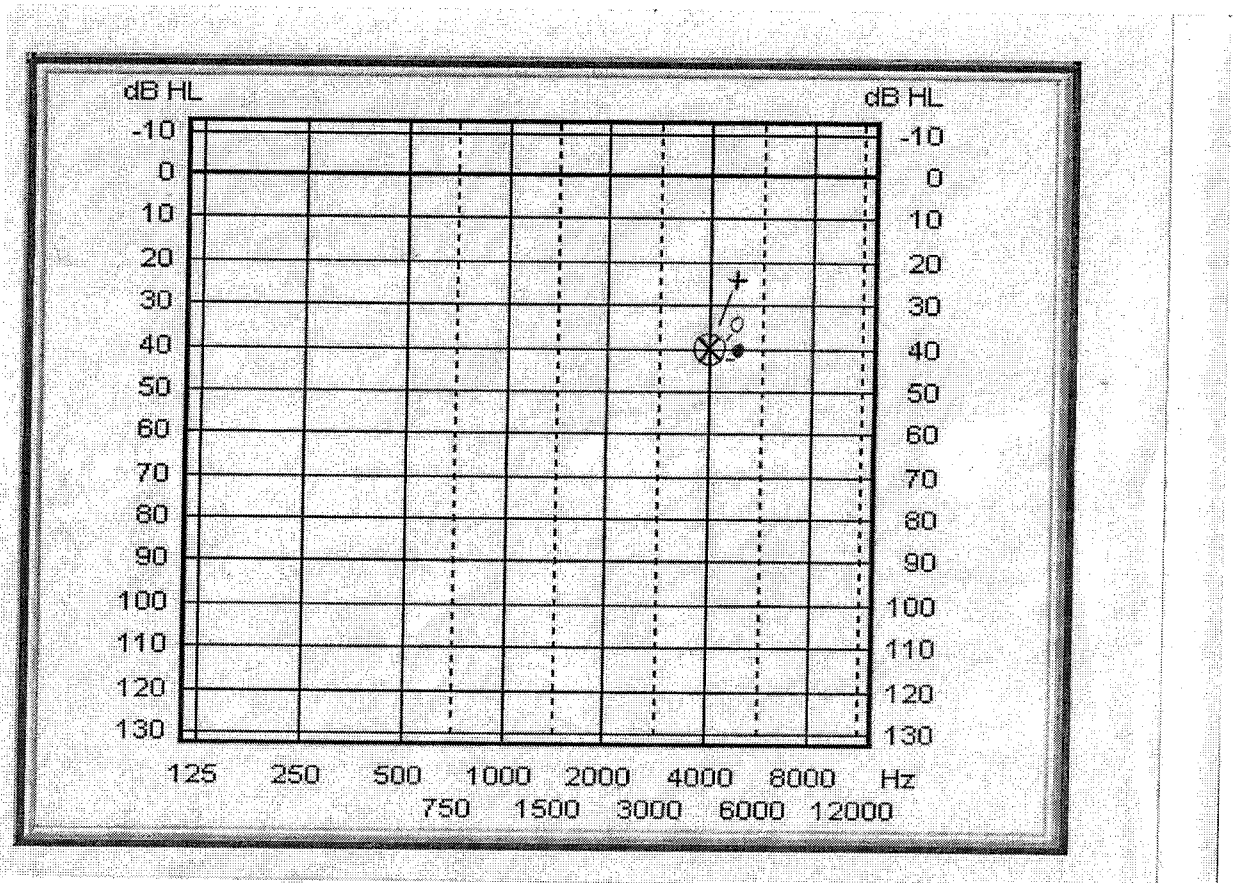


Fig. 11. Valutazione dell'intensità dell'acufene, in decibel hearing level, prima e dopo terapia di 6 mesi

VALUTAZIONE PRE TERAPIA

Soggetti (n. 216) con acufene, di intensità media di 40 dB



VALUTAZIONE POST TERAPIA

+ (Gruppo B): Soggetti (n. 72) Terapia: PEL 7 gr/sec, ET 1 sec, Frequenza 10 volte/die

° (Gruppo A): Soggetti (n. 72) Terapia: PEL 7 gr/sec, ET 1 sec, Frequenza 1 volta/die

• (Gruppo C): Soggetti (n.72) Terapie tradizionali