

Rejuvant®, una potenziale formulazione composta di allungamento della vita con alfa-chetoglutarato e vitamine, ha conferito una riduzione media di 8 anni dell'invecchiamento biologico, dopo una media di 7 mesi di utilizzo, nel test di metilazione del DNA TruAge

Oleksandr Demidenko^{1,*}, Diogo Barardo^{2,*}, Valery Budovskii¹, Francis R. Palmer³, Brian K. Kennedy^{2,3,4,5}, Yelena V. Budovskaya¹

¹TruMe Inc., Alameda, CA 94502, USA

²Healthy Longevity Translational Research Programme, Yong Loo Lin School of Medicine, National University Singapore, Singapore 117456, Singapore ³Ponce de Leon Health, Fernandina, FL 32034, USA ⁴Centre for Healthy Longevity, National University Health System, Singapore 117456, Singapore

⁵Singapore Institute for Clinical Sciences, A*STAR, Singapore 117609, Singapore

*Parità di contributo

Corrispondenza a: Brian K. Kennedy, Yelena V. Budovskaya; **e-mail:** bkennedy@nus.edu.sg, yelena@trumelabs.com **Parole chiave:** invecchiamento, metilazione del DNA, alfa-chetoglutarato (AKG), età biologica, Rejuvant **Ricevuto:** 5 ottobre 2021 **Accettato:** 15 novembre 2021 **Pubblicato:** 30 novembre 2021

Copyright: © 2021 Demidenko et al. Questo è un articolo ad accesso aperto distribuito secondo i termini della licenza [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/) (CC BY 3.0), che consente l'uso, la distribuzione e la riproduzione illimitati su qualsiasi supporto, a condizione che l'autore e la fonte originali siano citati.

ASTRATTO

Continua la ricerca di possibili interventi che ritardano e/o invertano l'invecchiamento biologico, con conseguente prolungamento della durata della salute e della vita. Gli interventi che ritardano l'invecchiamento nei modelli animali sono ben consolidati; tuttavia, la maggior parte manca di convalida negli esseri umani. La durata della vita umana rende poco pratico eseguire. Invece, sono stati sviluppati biomarcatori di invecchiamento, come gli orologi di metilazione del DNA (DNAm), per monitorare l'età biologica. Qui riportiamo un'analisi retrospettiva dell'età di metilazione del DNA in 42 individui che assumevano Rejuvant®, una formulazione a base di alfa-chetoglutarato, per un periodo medio di 7 mesi. Il test del DNAm è stato eseguito al basale e alla fine del trattamento con l'integrazione di Rejuvant®. Sorprendentemente, gli individui hanno mostrato una diminuzione media dell'invecchiamento biologico di 8 anni ($p\text{-value}=6.538 \times 10^{-12}$). Inoltre, l'integrazione con Rejuvant® è robusta rispetto alle differenze individuali, come indicato dal fatto che la grande maggioranza dei partecipanti ha ridotto la propria età biologica. Inoltre, abbiamo scoperto che Rejuvant® è di ulteriore beneficio per gli individui cronologicamente e biologicamente più anziani. Sebbene siano necessari test continui, in particolare in un progetto controllato con placebo, l'inversione di quasi 8 anni nell'età biologica degli individui che assumono Rejuvant® da 4 a 10 mesi è degna di nota, rendendo il cocktail di prodotti naturali un candidato intrigante per influenzare l'invecchiamento umano.

INTRODUZIONE

L'invecchiamento è un processo biologico quasi universale che si manifesta come un declino generale della salute e della vitalità, che alla fine porta alla morte. L'invecchiamento è associato allo sviluppo di una vasta gamma di malattie croniche, tra cui il cancro, l'Alzheimer, il diabete, le malattie cardiovascolari e molte altre condizioni [1, 2]. Se l'invecchiamento può essere

ritardato, l'insorgenza di malattie croniche sarà prevenuta, la capacità funzionale mantenuta e, con ogni probabilità, le complicanze dovute a malattie infettive, come Covid 19 e influenza, saranno ridotte [3]. In breve, gli esseri umani avranno una durata di vita e di salute più lunga.

L'invecchiamento è tipicamente misurato cronologicamente in giorni o anni, con una sopravvivenza umana media dell'ordine di

otto decenni. Se speriamo di controllare il processo di invecchiamento, dobbiamo imparare a misurare il tasso di invecchiamento in periodi di tempo più brevi. Inoltre, l'invecchiamento progredisce a ritmi diversi in individui diversi.

La nostra vera età biologica è influenzata da molti altri fattori, come il background genetico, lo stile di vita e la malattia. Per affrontare questa sfida, sono stati sviluppati diversi marcatori biologici dell'invecchiamento. Questi marcatori sono insiemi unici di molecole o cambiamenti nello stato epigenetico del DNA di un individuo che riflettono il loro attuale stato di invecchiamento [4-6]. Tra i biomarcatori più promettenti del processo di invecchiamento vi sono i modelli di metilazione del DNA. La metilazione del DNA è un meccanismo epigenetico che svolge un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica, dello sviluppo dell'organismo e della malattia [7, 8].

La metilazione dei residui di lisina all'interno degli istoni centrali, H3 e H4, avvia una modifica conformazionale nella struttura della cromatina che è associata a cambiamenti nell'attività trascrizionale. Tuttavia, il segno epigenetico più studiato è la metilazione diretta del DNA stesso. Questa modifica comporta la conversione della citosina in 5'-metilcitosina, catalizzata dalle DNA metiltransferasi, e si verifica tipicamente all'interno delle sequenze dinucleotidiche CpG (CpG). Queste sequenze CpG, raggruppate in regioni note come isole CpG (CGI), si trovano più spesso nei promotori dei geni housekeeping [9, 10]. È stato dimostrato che l'ipermetilazione delle isole CpG è collegata al silenziamento trascrizionale, mentre le isole CpG demetilate si trovano più spesso durante l'embriogenesi e fungono da segno distintivo dei geni trascritti attivamente. Durante l'invecchiamento, sono stati osservati e caratterizzati con cura due tipi di cambiamenti nella metilazione del DNA: (1) deriva epigenetica, o cambiamenti stocastici progressivi nei modelli di metilazione del DNA tra individui che si verificano con l'aumentare dell'età [11], e (2) l'orologio epigenetico - una misura derivata dalla metilazione del DNA che è altamente correlata con l'età cronologica e proposta per misurare l'età biologica [9, 12, 13].

L'orologio epigenetico è un interessante biomarcatore dell'invecchiamento perché si applica alla maggior parte dei tessuti umani, catturando aspetti dell'età biologica come la fragilità [14], l'idoneità cognitiva/fisica negli anziani [15], l'accelerazione dell'età nell'obesità [16], l'invecchiamento precoce nella sindrome di Down [17] e nell'infezione da HIV [18], nel Parkinson [19] e nelle neuropatologie correlate alla malattia di Alzheimer [20], così come nel cancro [21] e nello stress della vita [22]. I marcatori dell'invecchiamento biologico rappresentano uno strumento importante per validare clinicamente gli effetti degli interventi basati sulla longevità. Per la prima volta, questi biomarcatori dell'invecchiamento danno agli scienziati l'opportunità di studiare gli effetti dei composti anti-invecchiamento in tempo reale e direttamente sugli esseri umani. Uno dei più promettenti è il composto scoperto fino ad oggi è l'alfa-chetoglutarato (AKG) [23].

L'AKG è un metabolita intermedio endogeno nel ciclo di Krebs i cui livelli diminuiscono naturalmente durante l'invecchiamento. AKG è coinvolto in molteplici percorsi metabolici e cellulari. Questi includono il funzionamento come una (una) molecola di segnalazione, donatore di energia, precursore nella biosintesi degli amminoacidi e un regolatore dei processi epigenetici e della segnalazione cellulare tramite il legame proteico [24-26]. La carenza di AKG nelle cellule staminali e progenitrici aumenta con l'età [27]. Man mano che gli animali invecchiano, la funzione mitocondriale viene progressivamente compromessa e il flusso metabolico cellulare nei mitocondri diminuisce, il che aggrava la carenza di AKG. Mento et al. ha riferito che AKG ha aumentato la durata della vita di *C. elegans* [28]. Basandosi su questi risultati, l'AKG (e il sale di calcio) in combinazione con altri composti generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS) sono stati studiati nei topi. Il topo non geneticamente modificato è il modello di mammifero preferito per studiare l'invecchiamento, poiché i processi biochimici coinvolti nell'invecchiamento dei topi possono essere applicati ad altri mammiferi, compreso l'uomo [29]. In un recente studio, sponsorizzato da Ponce de Leon Health ed eseguito presso il Buck Institute for Research on Aging, l'effetto dell'alfa-chetoglutarato (consegnato sotto forma di sale di calcio - CaAKG) sulla durata della salute e della vita nei topi C57BL/6 è stato segnalato. Gli autori hanno dimostrato che nei topi, AKG ha ridotto la fragilità e aumentato la longevità, indicando una compressione della morbilità [23]. Queste e altre scoperte suggeriscono che l'AKG potrebbe essere un candidato ideale per gli studi sulla pro-longevità umana.

In questo studio, abbiamo esaminato l'associazione trasversale e longitudinale tra l'orologio epigenetico, lo stato di salute, l'idoneità fisica e gli effetti dell'assunzione di Rejuvant® (CaAKG a rilascio prolungato + una vitamina specifica a seconda del sesso) sull'invecchiamento biologico umano. Abbiamo seguito 42 individui sani dichiarati che avevano assunto l'integrazione di AKG per un periodo da 4 a 10 mesi. Vengono discussi gli effetti dell'AKG sull'invecchiamento biologico e la possibile correlazione di altri effetti fisiologici.

RISULTATI

Per questo studio, abbiamo esaminato 42 partecipanti che avevano scelto di assumere Rejuvant® per un periodo da 4 a 10 mesi. Tutti i partecipanti erano attivamente sul prodotto Rejuvant®. La necessità di far seguire a questo studio uno studio controllato con placebo è descritta nella Discussione. Le caratteristiche generali di questa coorte sono descritte nella Tabella 1. Tutti i partecipanti hanno riportato uno stato di salute buono o eccellente senza alcuna condizione medica cronica.

RISULTATI

Per questo studio, abbiamo esaminato 42 partecipanti che avevano scelto di assumere Rejuvant® per un periodo da 4 a 10 mesi. Tutti i partecipanti erano attivamente sul prodotto Rejuvant®. La necessità di far seguire a questo studio uno studio controllato con placebo è descritta nella Discussione. Le caratteristiche generali di questa coorte sono descritte nella Tabella 1. Tutti i partecipanti hanno riportato uno stato di salute buono o eccellente senza alcuna condizione medica cronica. Uno dei più promettenti è il composto scoperto fino ad oggi è l'alfa-chetoglutarato (AKG) [23].

Tabella 1. Caratteristiche descrittive dei partecipanti allo studio.

Partecipanti totali	42
Genere femminile Maschile)	14/28
Femmina:	
Età cronologica (mediana; intervallo)	64,09; da 43,49 a 72,46
Età biologica al basale (mediana; intervallo)	62,15; da 46,4 a 73
Età biologica a T7* (mediana; intervallo)	55,55; da 33,4 a 63,7
Maschio:	
Età cronologica (mediana; intervallo)	62,78; da 41,31 a 79,57
Età biologica al basale (mediana; intervallo)	61,85; da 41,9 a 79,7
Età biologica a T7* (mediana; intervallo)	53,3; da 33 a 74,9

*Indica l'età biologica misurata dal test TruMe dopo una media di sette mesi di trattamento.

ha continuato a fumare durante lo studio. La maggior parte dei partecipanti allo studio (66,7%, n = 28) era di sesso maschile. L'età cronologica media di questa coorte era di circa 63 anni.

Per tutti i 42 partecipanti, siamo stati in grado di misurare l'età biologica di riferimento utilizzando il modello di previsione dell'età TruMe prima che iniziassero a prendere Rejuvant®. Abbiamo utilizzato il modello di previsione TruAge con il sequenziamento di Sanger per l'analisi della metilazione del DNA. In totale, 3 geni inclusi 9 siti CpG sono stati analizzati dal sequenziamento di Sanger. I valori di metilazione del DNA ottenuti per tutti i siti CpG sono stati inclusi nel modello di previsione dell'età TruMe (in attesa di pubblicazione).

Abbiamo valutato l'errore di previsione del test epigenetico TruAge, come descritto in precedenza. Il confronto dei valori di età previsti rispetto a quelli effettivi produce un errore assoluto mediano di 4,23 anni. L'errore medio di 0,35 anni mostra che questa popolazione nel suo insieme potrebbe essere leggermente più giovane del previsto. È noto che la normalizzazione pre-elaborazione dei set di dati di metilazione del DNA e la loro varianza di età possono influenzare la differenza tra l'età stimata e quella cronologica. Una misura della robustezza di questi fattori implica il calcolo dei residui di una regressione lineare dell'età prevista rispetto a quella effettiva. Abbiamo scoperto che l'età stimata aveva un coefficiente di regressione di 0,88 e che la regressione lineare (linea adattata nella Figura 1) mostrava un R-quadrato aggiustato di 0,59 con un errore assoluto mediano di 3,97 anni. Infine, abbiamo anche trovato una correlazione lineare di Pearson statisticamente significativa (p value=2.026x10-9) di 0,77 (IC 95%: da 0,61 a 0,87) tra l'età stimata e quella effettiva della nostra coorte al basale.

Abbiamo anche considerato se ci fosse un pregiudizio sessuale nella valutazione dell'età biologica analizzando separatamente i maschi (28) e le femmine (14). Seguendo la stessa procedura di prima, per i maschi abbiamo trovato un errore assoluto mediano di

l'età prevista rispetto a quella effettiva di 4,92 anni e un errore medio di -0,22 anni. L'errore assoluto mediano della regressione lineare è stato di 4,64 anni, con un R quadrato corretto di 0,6 e un coefficiente di regressione di 0,90 (Figura 2). Inoltre, l'età stimata ed effettiva al basale per i maschi era linearmente correlata (valore p=7,74x10-7) con una grandezza di 0,78 (IC 95%: da 0,58 a 0,9). Per le femmine l'analoga procedura di regressione ha mostrato un errore assoluto mediano di 3,887 anni, con un R-quadrato aggiustato di 0,51 e un coefficiente di regressione di 0,83 (Figura 2). Inoltre, abbiamo riscontrato un errore assoluto mediano dell'età prevista rispetto a quella effettiva di 3,41 anni. L'errore medio di 1,48 anni potrebbe indicare che è probabile che le femmine della nostra coorte siano più giovani del previsto. Per esplorare questo, abbiamo applicato una regressione multilineare con il genere come variabile aggiuntiva all'intera nostra coorte. Il genere non è risultato essere un predittore statisticamente significativo dell'età cronologica al basale (Tabella 2). Inoltre, c'era una correlazione lineare statisticamente significativa (p-value=0,002) di 0,74 (IC 95%: da 0,35 a 0,91) tra l'età stimata e reale al basale per le femmine. In conclusione, nel contesto di questo set di dati limitato, non vi era alcuna differenza statistica nella capacità predittiva del test epigenetico TruAge rispetto a maschi e femmine.

I partecipanti hanno completato un sondaggio all'inizio e alla fine del processo. Questo questionario auto-riportato includeva informazioni su dieta, assunzione di alcol, consumo precedente di Rejuvant®, salute, altezza e peso (che consentivano la stima del BMI), durata del sonno, abitudine al fumo, frequenza dell'esercizio, livello di attività fisica, frequenza dei pasti, spuntini frequenza, numero di integratori alimentari aggiuntivi consumati e frequenza, stato dei capelli, istruzione, mentalità per uno stile di vita sano e fiducia negli integratori alimentari (tabella supplementare 1).

Abbiamo sfruttato le informazioni del sondaggio di base per verificare se c'erano altri fattori confondenti nella nostra coorte, che si esibivano

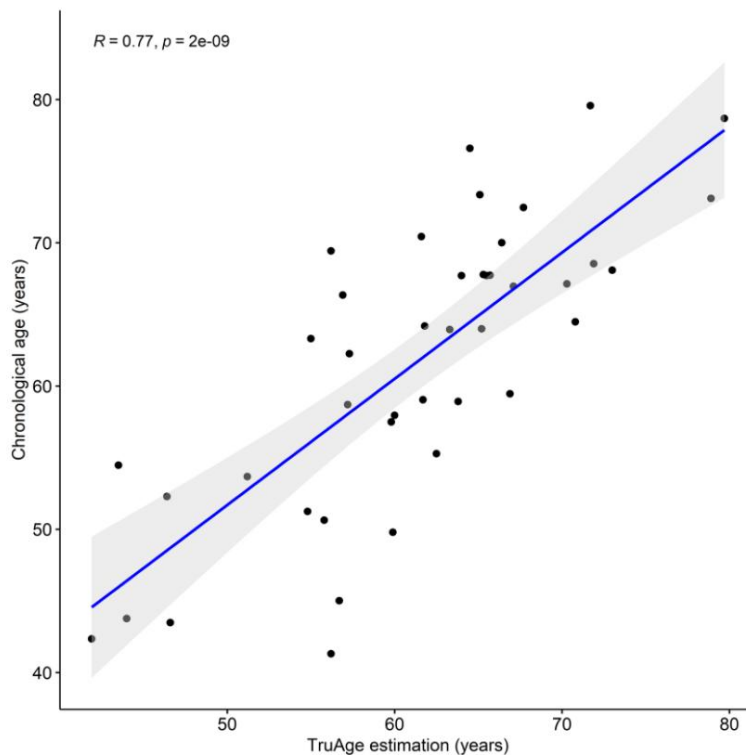


Figura 1. La stima dell'età TruAge e l'età cronologica di base sono correlate linearmente. L'età biologica TruAge è altamente (R -quadrato aggiustato = 0,77) statisticamente significativa (p -value = 2×10^{-9}) correlata con l'età cronologica dei 42 pazienti.

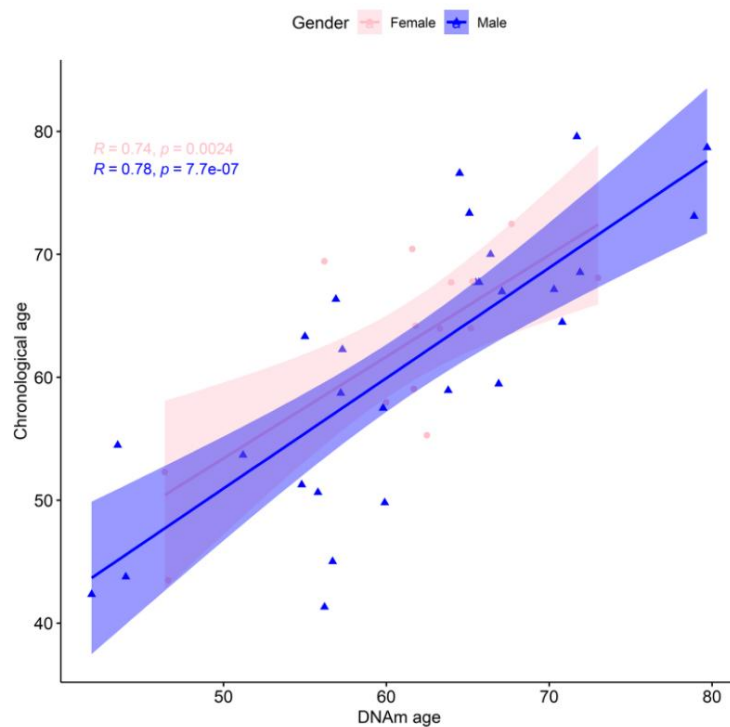


Figura 2. La stima dell'età TruAge e l'età cronologica di riferimento sono linearmente correlate, in entrambi i sessi. L'asse x rappresenta l'età di metilazione del DNA stimata da TruAge e l'asse y l'età cronologica dei 42 pazienti al basale. I grafici di correlazione lineare rosa e blu rappresentano la correlazione lineare similmente alta statisticamente significativa tra entrambi gli assi, rispettivamente per i pazienti di sesso femminile e maschile.

Tabella 2. Effetto di Rejuvant® sull'età biologica dei partecipanti allo studio.

Distribuzioni per età biologica	Partecipanti uomini (in anni)	Partecipanti donne (in anni)
Età biologica minima al basale		41,9 46,4
Età biologica mediana al basale	61,85	62.15
Età biologica media al basale	61,38	61.09
Massima età biologica al basale	79,7	73
Età biologica minima a T7*	33	33.4
Età biologica mediana a T7*	53.3	55,55
Età biologica media a T7*	53,53	54,66
Età biologica massima a T7*	74,9	63,7
Variazione minima dell'età biologica	-1,86	-0,41
Variazione mediana dell'età biologica	7,09	5,83
Variazione media dell'età biologica	8.44	6.98
Massima variazione dell'età biologica	22.7	14.09

*Indica l'età biologica misurata dal test TruMe dopo una media di sette mesi di trattamento.

una regressione lineare multivariata. A causa del numero considerevole di variabili predicative, abbiamo eseguito una regressione lineare graduale. Sebbene ci fossero covariate aggiuntive selezionate nel modello graduale, quando questo è stato confrontato, mediante analisi della varianza, con la regressione lineare univariata più semplice utilizzando esclusivamente l'età stimata TruAge, il valore p ottenuto era 0,12 (Tabella supplementare 2). Ciò indica che in termini di confronto, i due modelli non sono statisticamente significativamente diversi e, pertanto, è stato scelto il modello più semplice.

Era interessante determinare se la differenza tra età cronologica e TruAge fosse correlata allo stile di vita o a fattori demografici. In altre parole, è importante valutare se queste covariate sono associate a individui biologicamente più giovani o più anziani. Abbiamo selezionato BMI, consumo di alcol, salute autovalutata, durata del sonno, storia del fumo, frequenza e intensità dell'esercizio fisico e abbondanza di capelli come variabili predittive, poiché questo sottoinsieme delle informazioni del sondaggio raccolte può essere chiaramente associato e/o influenzare l'età biologica. La regressione lineare graduale non ha trovato alcuna associazione statisticamente significativa tra nessuna di queste variabili con la differenza tra età cronologica e biologica TruAge (Tabella supplementare 2). Da notare che il numero di partecipanti è piuttosto ridotto (ad esempio, c'era un fumatore e solo 6 che hanno riportato una storia di fumo). Pertanto, è probabile che uno o più di questi parametri dello stile di vita influenzino l'età biologica misurata dal test TruAge e che un set di dati più ampio sveli associazioni.

Risultati del consumo di CaAKG sull'età biologica

L'obiettivo dello studio era determinare l'effetto di Integrazione Rejuvant® sull'invecchiamento biologico umano

misurando la metilazione del DNA. Dopo la misurazione di base, a ciascun partecipante allo studio è stato somministrato Rejuvant® per tutta la durata dello studio. Anche se ai partecipanti è stato consigliato di utilizzare il trattamento per 4-6 mesi, vi sono state notevoli differenze individuali nella durata del trattamento. Al termine del periodo di trattamento scelto autonomamente, i partecipanti hanno inviato i loro campioni di saliva per l'analisi della loro età biologica utilizzando i test TruMe disponibili in commercio.

Sulla base dei questionari presentati al basale e alla fine dello studio, abbiamo identificato un sottogruppo di 13 individui che non hanno riportato cambiamenti nel tipo di dieta, nella frequenza del consumo, nell'assunzione di integratori alimentari aggiuntivi, nella durata del sonno e nella frequenza dell'esercizio. Questo sottoinsieme omogeneo è stato quindi utilizzato per la valutazione preliminare dell'effetto indipendente di CaAKG, poiché le altre covariate sono controllate in base alla progettazione.

Al basale, questo sottoinsieme o la nostra coorte era in media di 2,06 anni biologicamente più giovane della loro età cronologica. Alla fine del trattamento questa sottopopolazione era in media di 9,74 anni biologicamente più giovane della rispettiva età cronologica. Utilizzando il t-test accoppiato a due campioni Welch unilaterale, questa differenza in media di 7,69 anni è risultata statisticamente significativa, con un valore p di $7,263 \times 10^{-5}$ (Figura 3). È interessante notare che ogni soggetto in questo piccolo gruppo ha diminuito la propria età biologica.

Dopo aver scoperto che l'integrazione di CaAKG riduceva costantemente l'età epigenetica in una piccola popolazione omogenea, abbiamo continuato valutando i suoi effetti sull'intera coorte di 42 pazienti. Al basale, la coorte era in media di 0,35 anni biologicamente più giovane della loro età cronologica. Alla fine del trattamento, questo valore è cambiato in una media di 8,31 anni biologicamente più giovane dei rispettivi

età cronologica. Utilizzando il test t accoppiato a due campioni Welch unilaterale, questa differenza in media di 7,96 anni è risultata statisticamente significativa, con un valore p di $6,538 \times 10^{-12}$ (Figura 4).

La formulazione dell'integratore Rejuvant® è essa stessa diversa per maschi e femmine. Nello specifico, oltre al CaAKG, vengono aggiunte vitamina A e vitamina D

alla formulazione commerciale maschile o femminile, rispettivamente (vedi Metodi). Indipendentemente da ciò, l'effetto dell'integrazione con Rejuvant® riduce l'età epigenetica in modo statisticamente significativo nei maschi e nelle femmine (Figura 5). La diminuzione media accoppiata è di 8,44 anni nei maschi e di 6,98 anni nelle femmine. Solo 2 individui (1 maschio e 1 femmina) hanno mostrato un leggero aumento dell'età biologica.

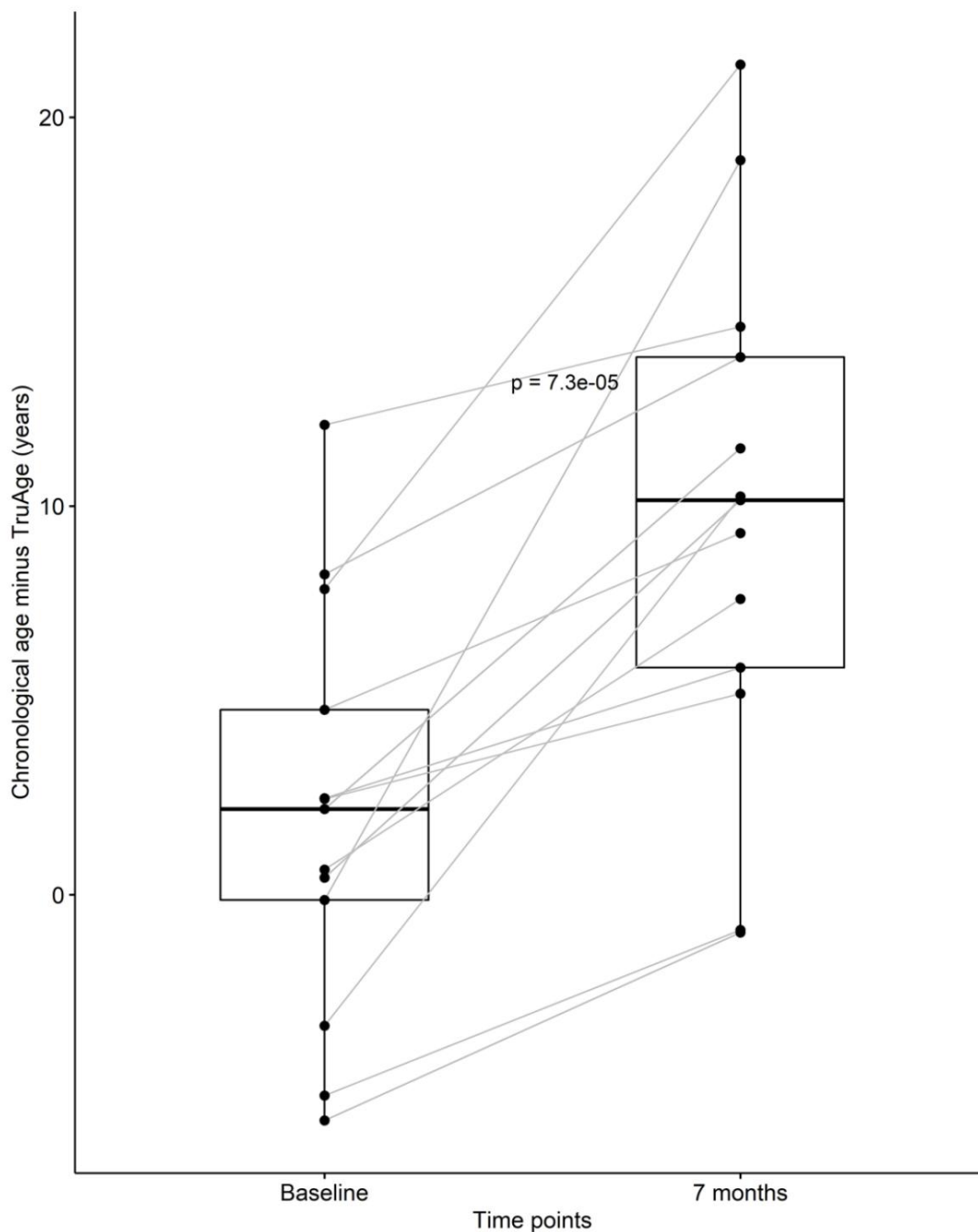


Figura 3. CaAKG ha ridotto l'età di metilazione in una sottopopolazione omogenea. I box plot accoppiati rappresentano gli effetti del trattamento a livello di paziente e di gruppo ($n=13$), tra il basale e la fine dello studio (che in media ha avuto una durata di 7 mesi). I box plot rappresentano la mediana e il 25° e 75° quartile.

La validità dell'analisi statistica che utilizza l'intera coorte si basa sulla modellazione di covariate, per il rilevamento di variabili che determinano una differenza statisticamente significativa nel test di metilazione del DNA TruMe, abbiamo utilizzato regressioni graduali in modo iterativo. Questa procedura è culminata nel modello più parsimonioso utilizzando solo l'età cronologica di base e la differenza tra

età cronologiche e biologiche di base, come gli unici predittori statisticamente significativi dell'entità della diminuzione dell'età epigenetica da parte di Rejuvant®. Di conseguenza, abbiamo modellato l'effetto dell'integrazione di Rejuvant® sull'età della metilazione come una regressione lineare di queste due variabili. Questi dati indicano che le persone con età biologica maggiore (rispetto alla loro età

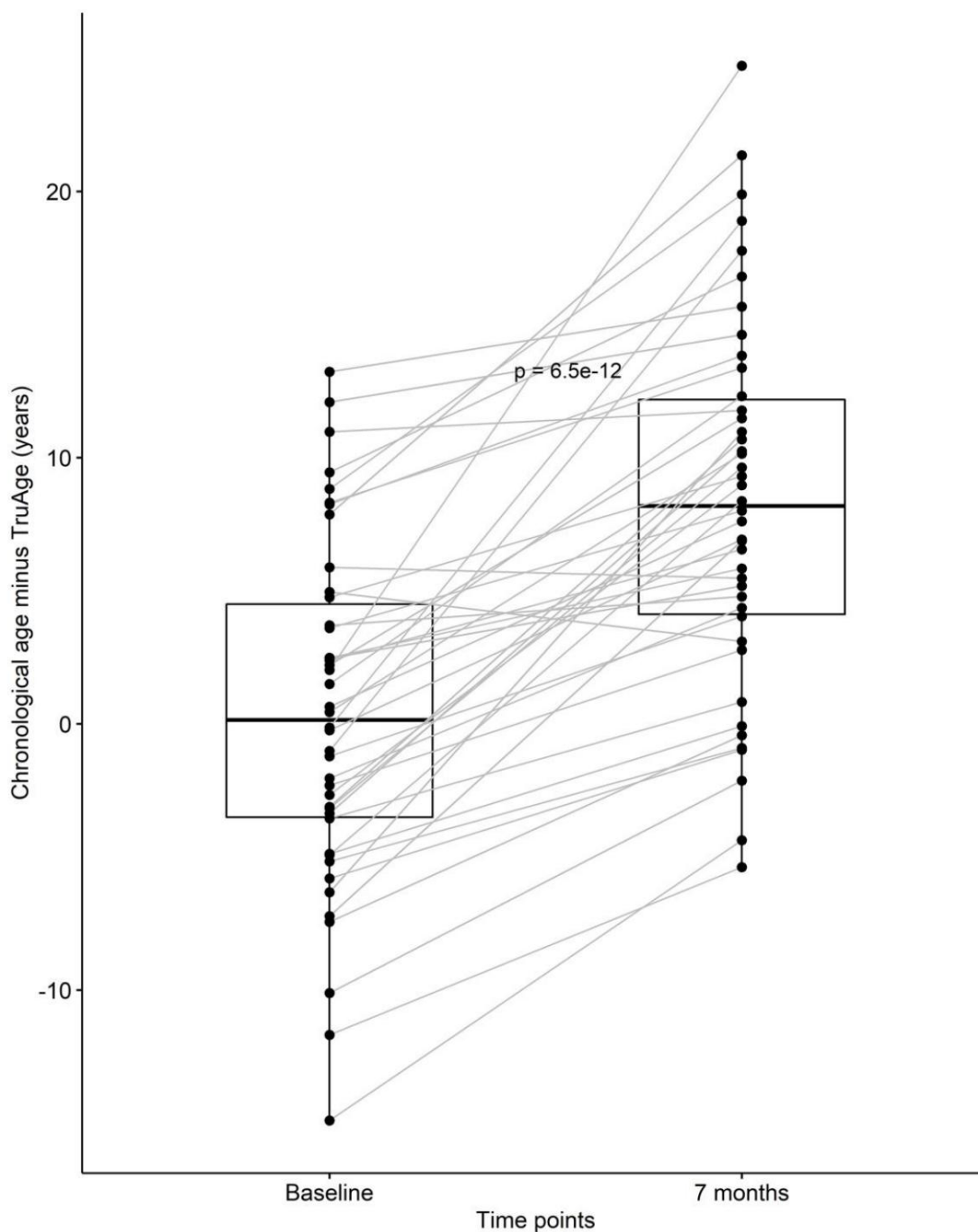


Figura 4. CaAKG ha ridotto l'età di metilazione nell'intera coorte. I box plot appaiati rappresentano gli effetti del trattamento a livello di paziente e di gruppo (n=42), tra il basale e la fine dello studio (che in media ha avuto una durata di 7 mesi). I box plot rappresentano la mediana e il 25° e 75° quartile.

e/o le persone con un'età cronologica di riferimento elevata hanno la risposta più ampia a Rejuvant®.

Utilizzando il modello ridotto finale, con solo le due variabili risultate essere statisticamente significativamente correlate con una diminuzione dell'età epigenetica nel corso del trattamento, la differenza di età epigenetica (in anni) di circa 7 mesi di integrazione con CaAKG può essere modellata dal modello equazione:

$$\text{Diminuire TruAge} = -0,22 \cdot \text{age} + 0,45 \cdot \text{diffAge}$$

dove "age" indica l'età cronologica all'inizio del trattamento e "diffAge" è definito come la differenza tra l'età cronologica e l'età TruMe al basale.

È raffigurato il piano che rappresenta questa regressione (Figura 6).

È interessante notare che la durata del trattamento non è correlata con l'entità dell'effetto dell'integrazione di Rejuvant®. Ciò indica che la durata mediana del trattamento della nostra coorte, circa 7 mesi, potrebbe essere sufficiente per saturare i benefici dell'integrazione.

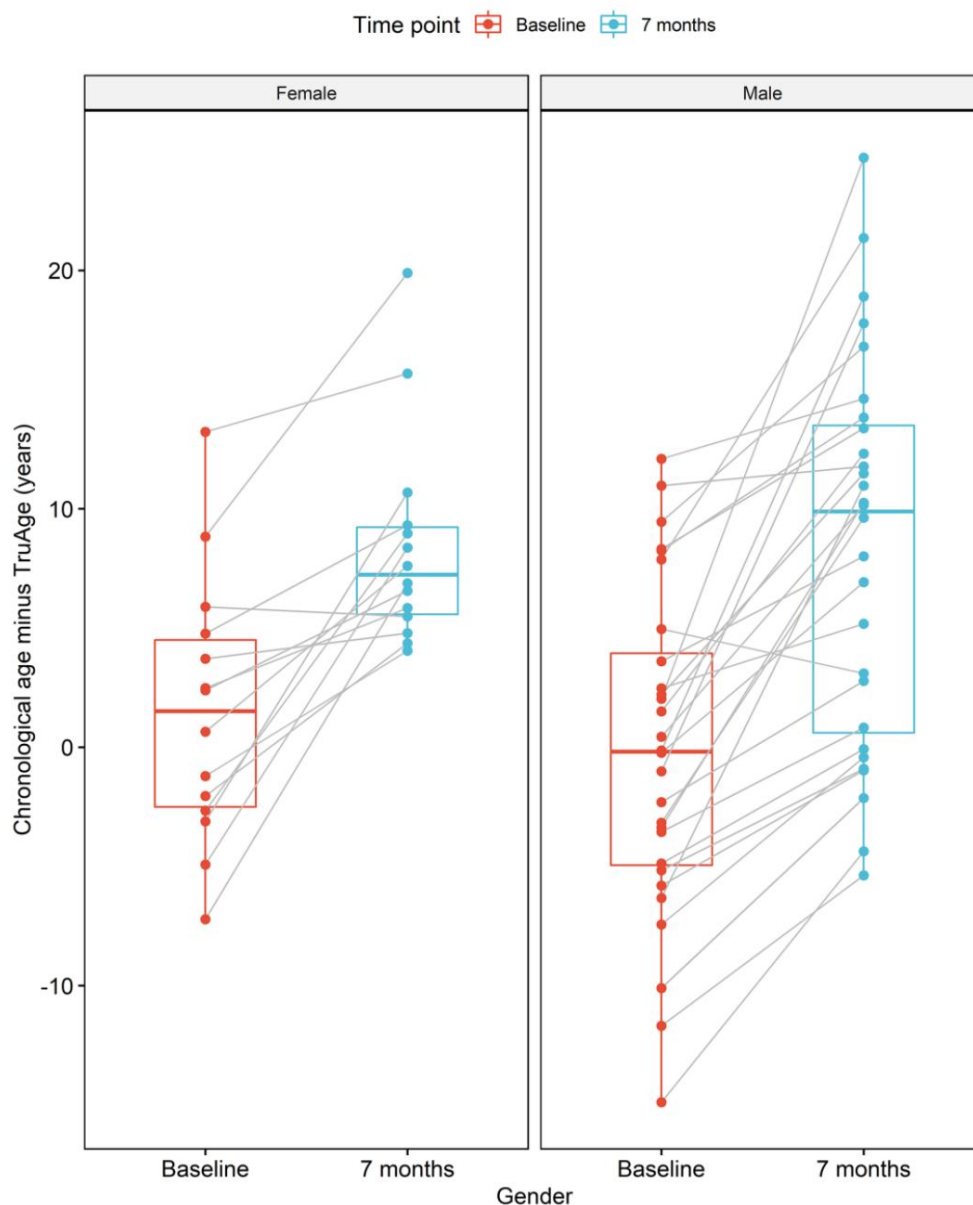


Figura 5. CaAKG riduce l'età di metilazione indipendentemente dal sesso. L'immagine mostra gli effetti di CaAKG sull'età della metilazione tra l'inizio e la fine del trattamento, suddivisi per sesso. Per ogni genere, i box plot rosso e blu rappresentano i dati al basale e all'endpoint. I boxplot sono basati sulla mediana e sul 25° e 75° quartile.

È interessante notare che questa scoperta è coerente con le estrapolazioni matematiche di uno studio su larga scala di misurazioni complete dell'emocromo, che prevedono che gli effetti di un intervento sulla longevità in una popolazione sana si satureranno in un breve periodo di tempo [30]. Questo stesso studio prevedeva che i benefici di tali interventi sarebbero stati maggiori negli individui più vicini a uno stato di fragilità, in linea con i nostri dati.

Detto questo, rimangono pochissimi dati sull'uso a lungo termine di Rejuvant® o su dosi più elevate del prodotto, e sono possibili ulteriori effetti sull'età biologica. Inoltre, non abbiamo misurato se i benefici in età biologica vengono persi se il supplemento viene interrotto, pertanto potrebbe essere necessaria un'integrazione continua per mantenere gli effetti osservati.

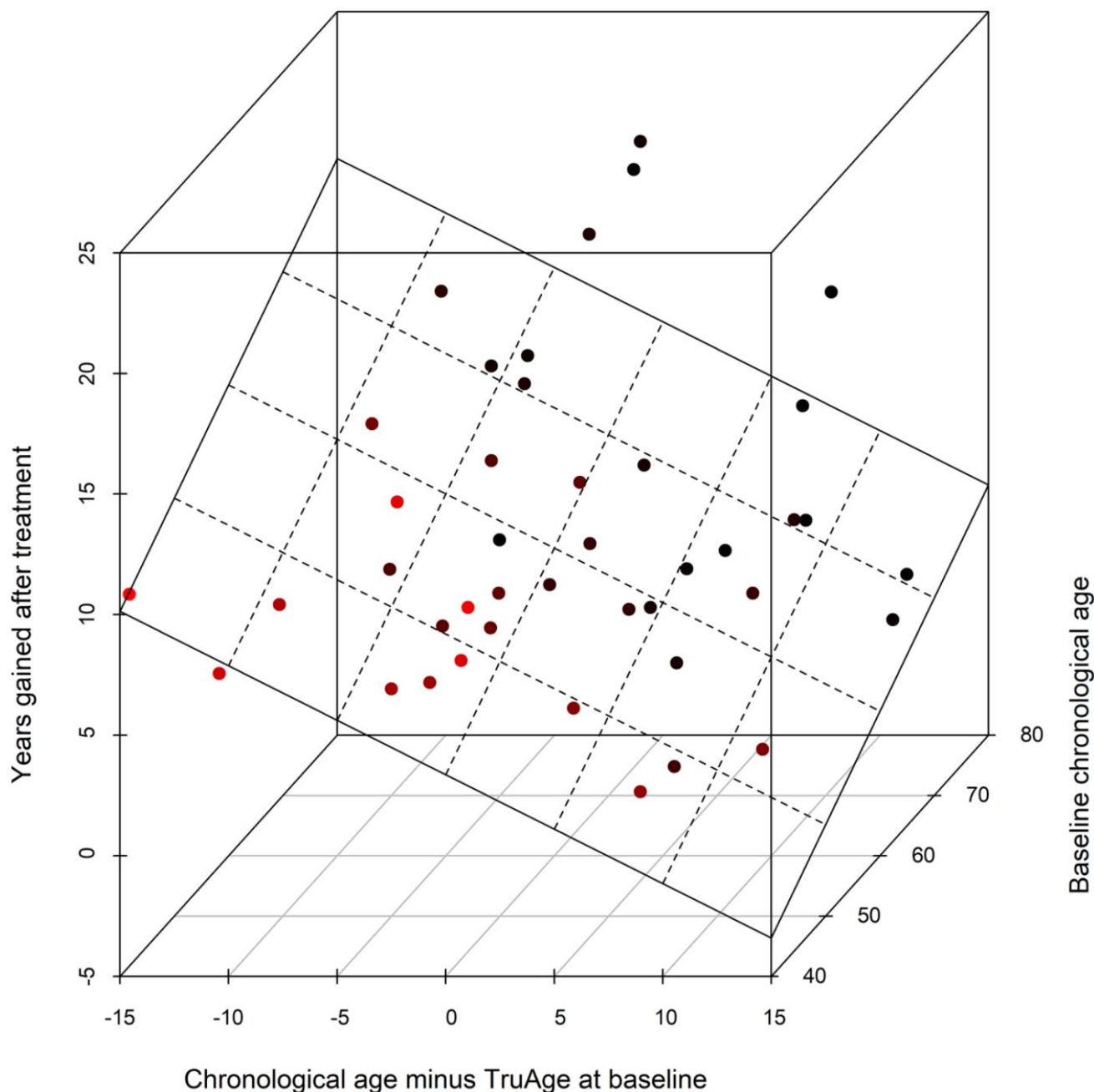


Figura 6. Grafico a dispersione 3D delle covariate che influenzano l'efficacia del trattamento CaAKG. L'asse x si riferisce alla differenza, in anni, tra l'età cronologica e quella biologica al basale (un paziente in uno stato più anziano avrà un valore positivo maggiore). L'asse y rappresenta l'effetto del trattamento CaAKG in termini di anni in cui l'età della metilazione è diminuita (valori più alti indicano maggiori benefici). L'asse z è l'età cronologica al basale (i pazienti più anziani saranno "più profondi"). Il piano 3D è stato tracciato utilizzando la regressione lineare di entrambe le covariate all'effetto del trattamento.

DISCUSSIONE

AKG ha dimostrato di estendere la durata della vita in vari sistemi modello. In questo studio, abbiamo utilizzato un algoritmo sviluppato in precedenza che prevede l'età biologica umana per determinare se Rejuvant®, il rilascio prolungato di CaAKG + vitamine ha un effetto benefico sulla longevità umana. Un totale di 42 individui, noti per assumere Rejuvant® e che avevano inviato campioni di saliva per il test di metilazione del DNA, sono stati selezionati per partecipare a un'indagine e analisi sui risultati dell'invecchiamento biologico dei clienti.

Il loro DNAm TruAge Index era stato misurato al basale (prima di iniziare Rejuvant®) e testato nuovamente dopo una media di 7 mesi di utilizzo. Complessivamente, questi 42 individui hanno mostrato una riduzione media statisticamente significativa della loro età biologica di circa 8 anni.

Il pensiero generale nel campo della ricerca sull'invecchiamento è che è probabile che gli interventi influenzino sottogruppi della popolazione e nessun intervento (stile di vita o piccola molecola) ritarderà o ridurrà l'età biologica nell'intera popolazione. Sorprendentemente, in questo gruppo la stragrande maggioranza dei partecipanti ha risposto con una riduzione dell'età biologica dopo il trattamento con Rejuvant®. Sebbene lo studio abbia dei limiti (descritti di seguito), questi risultati sono incoraggianti. È interessante notare che c'erano due parametri che hanno influenzato l'entità della risposta: quei partecipanti con età biologica più alta rispetto all'età cronologica e quelli con età cronologica più alta al basale. Ciò suggerisce, forse contrariamente alle aspettative dato il ruolo noto dell'AKG nell'aumentare le prestazioni dell'esercizio, che Rejuvant® ha una risposta più ampia nei partecipanti biologicamente più anziani della loro età cronologica. Si potrebbe anche prevedere questo risultato per un intervento sulla longevità sulla base dell'ipotesi che gli individui con un'età biologica relativa bassa stiano già subendo un invecchiamento quasi ottimizzato e abbiano meno da guadagnare. Attualmente, non ci sono dati sufficienti sull'invecchiamento umano per prevedere quali popolazioni risponderanno a un particolare intervento.

Il test di metilazione TruAge, che rimane proprietario, è stato sviluppato esaminando un numero limitato di siti di metilazione nelle isole di promotori CpG, sulla base dell'ottimizzazione dell'età cronologica utilizzando un approccio di apprendimento automatico. Sebbene esamini una porzione più piccola del genoma rispetto ad altri orologi di metilazione, ha il vantaggio di essere più conveniente. Inoltre, il test TruAge è facilmente utilizzato dai consumatori, che mettono la saliva su un cartoncino di carta e spediscono il campione per l'analisi. È stato dimostrato che il test TruAge riporta risultati simili rispetto ad altri orologi epigenetici (non pubblicati), tuttavia ulteriori test utilizzando altri orologi di metilazione e diversi biomarcatori dell'invecchiamento sarebbero utili per misurare gli effetti di Rejuvant®

sulla longevità umana. Una domanda fondamentale riguardo alle diverse misure di invecchiamento biologico riguarda il loro livello di concordanza: misurano aspetti uguali, sovrapposti o completamente diversi del processo di invecchiamento?

I dati di questo studio, sebbene limitati, suggeriscono che CaAKG può effettivamente influire sull'invecchiamento, almeno come misurato dalla metilazione. Vale anche la pena notare che AKG è un substrato noto per le DNA demetilasi [31], che potenzialmente demetilano i siti del DNA interrogati da TruAge. Tuttavia, l'integrazione di AKG porta sia alla demetilazione che all'ipermetilazione di alcuni siti CpG nelle cellule della saliva, suggerendo che Rejuvant® può avere un effetto maggiore sugli orologi di invecchiamento basati sulla metilazione rispetto ad altri indicatori dell'età biologica.

Ci sono diverse limitazioni a questo studio. In primo luogo, non è controllato con placebo. Pertanto, una potenziale preoccupazione è che l'effetto placebo possa aver contribuito in una certa misura ai cambiamenti osservati. Tuttavia, la fiducia auto-risportata nell'efficacia degli integratori alimentari non è stata considerata un predittore statisticamente significativo in nessuno dei nostri modelli di regressione, il che mitiga il rischio in una certa misura. Inoltre, lo studio descrive una dimensione del campione limitata e non siamo stati in grado di raccogliere altri tipi di dati relativi all'invecchiamento, ad esempio marcatori clinici di invecchiamento e malattia, e applicare altri orologi biologici di invecchiamento. Saranno necessari futuri studi clinici randomizzati per confermare i risultati qui presentati. Tuttavia, i risultati in questo manoscritto suggeriscono che Rejuvant® può avere effetti significativi sull'età biologica misurata dalla metilazione del DNA dei campioni di saliva.

MATERIALI E METODI

Partecipanti

Un gruppo di 42 individui sani dichiarati (14 femmine e 28 maschi) che avevano presentato campioni di saliva (due campioni per soggetto). I campioni di saliva sono stati raccolti al basale (T0) e 4-10 mesi dopo che il partecipante ha iniziato a prendere Rejuvant® (T7) a una dose fissa di due compresse al giorno. Ogni dose conteneva 1 grammo di alfa-chetoglutarato di calcio, insieme a vitamina A per la formulazione del partecipante maschio o vitamina D per la formulazione del partecipante femmina, e consegnata in una formulazione a rilascio temporizzato, come illustrato nelle etichette della formulazione.

TruMe ha identificato i potenziali partecipanti allo studio di tutti i clienti con due test DNAm completati in precedenza (uno basale prima di iniziare e un secondo test da 4 a 10 mesi di integrazione con Rejuvant®). integrazione nella dieta, esercizio fisico, sonno, alcol

consumo, fumo e uso di integratori alimentari.

Il modulo di consenso includeva la seguente dichiarazione: "TruMe vorrebbe avere il tuo permesso per utilizzare i risultati della tua età biologica per scopi scientifici e accademici. Sarai sempre anonimo e nessuna informazione di identificazione personale sarà mai condivisa.

TruMe non utilizza il sequenziamento completo del genoma e pertanto non genera né conserva dati geneticamente identificabili. Non vendiamo mai i tuoi dati o informazioni personali." I partecipanti che hanno fornito il consenso appropriato seguendo i principi GCP, sono stati inclusi nello studio. L'analisi dei dati dei partecipanti è stata eseguita in forma aggregata e anonima (Tabella 1).

Vitamina A (come palmitato di retinile)	900 mcg	100%
Calcio	190mg	15%

Alfa-chetoglutarato di calcio Monoidrato (LifeAKG™)	1000mg†
---	---------

Vitamina D	25 mcg
Calcio	190 mg

Alfa-chetoglutarato di calcio Monoidrato (LifeAKG™)	1000 mg
---	---------

Raccolta dei campioni e sequenziamento del bisolfato

I campioni di saliva sono stati raccolti autonomamente dai partecipanti a casa utilizzando i kit di campionamento TruMe disponibili in commercio. Ai partecipanti è stato chiesto di raccogliere circa 200-300 ml dei loro campioni di saliva su FTA Classic Cards (FTA Classic Cards, #WB120205, da GE Healthcare Life Sciences). I campioni di saliva sono stati lasciati asciugare all'aria per 30-45 minuti, prima di essere spediti ai TruMe Labs.

Metilazione del DNA e calcolo dell'età del DNAm

Da ciascun campione sono stati ottenuti cerchi di 1 pollice di diametro e il DNA è stato eluito con il kit Quick-DNA Microprep Plus (ZymoResearch, CA, USA) secondo il protocollo del produttore. 200-500 ng di DNA eluito sono stati convertiti con bisolfito con il kit EZ DNA Methylation Lighting™ secondo le istruzioni del produttore (ZymoResearch, CA, USA). L'amplificazione PCR del DNA convertito con bisolfito è stata eseguita utilizzando primer specifici per target standard (IDT, Newark, NJ, USA). La reazione PCR è stata allestita utilizzando ZymoTaq PreMix E2004 (ZymoResearch, CA, USA).

Ogni frammento di PCR è stato analizzato utilizzando il protocollo di sequenziamento standard Sanger e i livelli di metilazione sono stati analizzati utilizzando un algoritmo proprietario, sviluppato da TruMe Inc. L'algoritmo di previsione dell'età TruMe utilizza un

modello multivariato per prevedere l'età biologica dell'individuo.

analisi statistica

I dati sono stati analizzati e i grafici generati utilizzando il linguaggio di programmazione R. Le variabili continue sono state testate per la normalità utilizzando il test di Shapiro-Wilk.

Nei casi in cui non riusciamo a rifiutare l'ipotesi nulla (valore p non inferiore a 0,05) è stato utilizzato il test t appaiato a due campioni di Welch unilaterale, altrimenti è stato utilizzato il test appaiato per ranghi con segno di Wilcoxon unilaterale con correzione di continuità [32]. Le figure 1–5 sono state realizzate utilizzando il pacchetto R 'ggpubr'. La Figura 6 è stata creata utilizzando il pacchetto R 'scatterplot3d' [33].

CONTRIBUTI D'AUTORE

OD ha contribuito alla creazione del test TruMe Age ed è stato responsabile degli esperimenti che ne prevedevano l'uso. DB ha eseguito l'analisi statistica dei dati e ha partecipato alla composizione del manoscritto. VB ha assistito con l'analisi statistica dei dati. RF ha assistito con il controllo e l'analisi della qualità dei dati, nonché con la composizione del manoscritto. FRP ha partecipato alla progettazione dello studio, alla composizione del manoscritto e all'analisi dei dati. BKK ha partecipato alla progettazione dello studio, alla composizione del manoscritto e all'analisi dei dati. YVB ha partecipato alla creazione del test TruMe Age, alla progettazione dello studio, alla composizione del manoscritto e all'analisi dei dati.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori desiderano ringraziare i membri del laboratorio Kennedy al NUS, nonché i dipendenti di TruMe Labs e PDL Health per i commenti sul manoscritto.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nel luglio del 2019, TruMe ha stipulato un contratto di servizio clienti non esclusivo per il test di metilazione del DNA dei clienti di Ponce de Leon Health che assumevano Rejuvant®. Né TruMe né Ponce de Leon Health hanno proprietà incrociate o altri interessi finanziari da segnalare. BKK è consulente scientifico e membro del consiglio di Ponce de Leon Health.

FINANZIAMENTO

I dati per il manoscritto sono stati acquisiti dagli utenti del prodotto Rejuvant da Ponce de Leon Health e dall'analisi della metilazione del DNA fornita da TruMe Labs. I dati sono stati forniti all'Università nazionale di Singapore per l'analisi statistica, che ha fornito supporto finanziario per questa componente del progetto.

RIFERIMENTI

1. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, et al.
Geroscienza: collegare l'invecchiamento alle malattie croniche. *Cellula*. 2014; 159:709–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039> PMID:25417146

2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. I tratti distintivi dell'invecchiamento. *Cellula*. 2013; 153:1194–217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039> PMID:23746838

3. Kennedy BK, Pennypacker JK. Farmaci che modulano l'invecchiamento: il percorso promettente ma difficile da percorrere. *Transl Res*. 2014; 163:456–65. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.007> PMID:24316383

4. Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B.
Biomarcatori dell'invecchiamento: dalla funzione alla biologia molecolare. *Nutrienti*. 2016; 8:338. <https://doi.org/10.3390/nu8060338> PMID:27271660

5. Giustizia JN, Ferrucci L, Newman AB, Aroda VR, Bahnson JL, Divers J, Espeland MA, Marcovina S, Pollak MN, Kritchevsky SB, Barzilay N, Kuchel GA. Un quadro per la selezione di biomarcatori basati sul sangue per gli studi clinici guidati dalla geroscienza: rapporto del TAME Biomarkers Workgroup. *Geroscienza*. 2018; 40:419–36. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0042-y> PMID:30151729

6. Kudryashova KS, Burka K, Kulaga AY, Vorobyeva NS, Kennedy BK.
Biomarcatori dell'invecchiamento: dai test funzionali agli approcci multi-omici. *Proteomica*. 2020; 20:e1900408. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900408> PMID:32084299

7. Cavalli G, Heard E. I progressi nell'epigenetica collegano la genetica all'ambiente e alla malattia. *Natura*. 2019; 571:489–99. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0> PMID:31341302

8. Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, Wren JD, Porter H, Richardson A. Il ruolo della metilazione del DNA nell'epigenetica dell'invecchiamento. *Pharmacol Ther*. 2019; 195:172–85. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.001> PMID:30419258

9. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, et al. Genome-wide i profili di metilazione rivelano viste quantitative dei tassi di invecchiamento umano. *Cella Mol*. 2013; 49:359–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016> PMID:23177740

10. Jin B, Li Y, Robertson KD. Metilazione del DNA: superiore o subordinata nella gerarchia epigenetica? *Geni Cancro*. 2011; 2:607–17. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957> PMID:21941617

11. Teschendorff AE, West J, Beck S. Deriva epigenetica associata all'età: implicazioni e un caso di parsimonia epigenetica? *Hum Mol Genet*. 2013; 22:R7–15. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt375> PMID:23918660

12. Horvath S. Età di metilazione del DNA di tessuti umani e tipi di cellule. *Genoma Biol*. 2013; 14:R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115> PMID:24138928

13. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Predittore epigenetico dell'età. *PLoS One*. 2011; 6:e14821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821> PMID:21731603

14. Breitling LP, Saum KU, Perna L, Schöttker B, Holleczeck B, Brenner H. La fragilità è associata all'orologio epigenetico ma non alla lunghezza dei telomeri in una coorte tedesca. *Epigenetica Clin*. 2016; 8:21. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0186-5> PMID:26925173

15. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Ritchie SJ, Muniz Terrera G, Harris SE, Gibson J, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Taylor A, Murphy L, et al. L'orologio epigenetico è correlato con l'idoneità fisica e cognitiva nella Lothian Birth Cohort 1936. *Int J Epidemiol*. 2015; 44:1388–96. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu277> PMID:25617346

16. Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, von Schönfels W, Ahrens M, Heits N, Bell JT, Tsai PC, Spector TD, Deloukas P, Siebert R, Sipsos B, et al.
L'obesità accelera l'invecchiamento epigenetico del fegato umano. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111:15538–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412759111> PMID:25313081

17. Horvath S, Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Salvioli S, Gentilini D, Di Blasio AM, Giuliani C, Tung S, Vinters HV, Franceschi C. Invecchiamento epigenetico accelerato nella sindrome di Down. *Cellula di invecchiamento*. 2015; 14:491–95. <https://doi.org/10.1111/accel.12325> PMID:25678027

18. Lagathu C, Cossarizza A, Béréziat V, Nasi M, Capeau J, Pinti M. Scienza di base e patogenesi dell'invecchiamento con HIV: potenziali meccanismi e biomarcatori. *AIDS*. 2017 (Supplemento 2); 31:S105–19.

- <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001441>
PMID:28471941
19. Horvath S, Ritz BR. Aumento dell'età epigenetica e della conta dei granulociti nel sangue dei pazienti con malattia di Parkinson. *Invecchiamento* (Albany NY). 2015; 7:1130–42. <https://doi.org/10.18632/aging.100859> PMID:26655927
20. Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. L'età epigenetica della corteccia prefrontale è associata a placche neuritiche, carico amiloide e funzionamento cognitivo correlato alla malattia di Alzheimer. *Invecchiamento* (Albany NY). 2015; 7:1198–211. <https://doi.org/10.18632/aging.100864> PMID:26684672
21. Ambatipudi S, Horvath S, Perrier F, Cuenin C, Hernandez-Vargas H, Le Calvez-Kelm F, Durand G, Byrnes G, Ferrari P, Bouaoun L, Sklias A, Chajes V, Overvad K, et al. L'analisi del metiloma del DNA identifica l'invecchiamento epigenetico accelerato associato alla suscettibilità al cancro al seno in postmenopausa. *Euro J Cancro*. 2017; 75:299–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.014> PMID:28259012
22. Zannas AS, Arloth J, Carrillo-Roa T, Iurato S, Röh S, Ressler KJ, Nemeroff CB, Smith AK, Bradley B, Heim C, Menke A, Lange JF, Brückl T, et al. Lo stress della vita accelera l'invecchiamento epigenetico in una coorte urbana afroamericana: rilevanza della segnalazione dei glucocorticoidi. *Genoma Biol*. 2015; 16:266. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0828-5> PMID:26673150
23. Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao CY, Hsu YM, Lucanic M, Asadi Shahmirzadi A, Wiley CD, Gan G, Kim DE, Kasler HG, Kuehnemann C, Kaplowitz B, Bhaumik D, et al. L'alfa-chetoglutarato, un metabolita endogeno, prolunga la durata della vita e comprime la morbilità nei topi che invecchiano. *Cell Metab*. 2020; 32:447–56.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.004> PMID: 32877690
24. Xiao D, Zeng L, Yao K, Kong X, Wu G, Yin Y. Il metabolismo della glutammina-alfa-chetoglutarato (AKG) e le sue implicazioni nutrizionali. *Aminoacidi*. 2016; 48:2067–80. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2254-8> PMID:27161106
25. Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D. Alpha Ketoglutarate: applicazioni fisiologiche e funzionali. *Biomol Ther* (Seoul). 2016; <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.078> PMID:26759695
26. Zdzisiyńska B, Jurek A, Kandefer-Szerszeń M. Alpha Ketoglutarate come molecola con attività pleiotropica: possibilità ben note e nuove di uso terapeutico. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017; 65:21–36. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0406-x> PMID:27326424
27. Harrison AP, Pierzynowski SG. Effetti biologici del 2-ossoglutarato con particolare enfasi sulla regolazione dell'assorbimento/metabolismo di proteine minerali, ferro, calcio, magnesio, zinco e sodio da una prospettiva di invecchiamento sano all'avanguardia. *J Physiol Pharmacol*. 2008 (Supplemento 1); 59:91–106. PMID: 18802218
28. Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, Deng G, Diep S, Lomenick B, Meli VS, Monsalve GC, Hu E, Whelan SA, Wang JX, et al. Il metabolita α -chetoglutarato prolunga la durata della vita inibendo l'ATP sintasi e il TOR. *Natura*. 2014; 510:397–401. <https://doi.org/10.1038/nature13264> PMID:24828042
29. Liao CY, Kennedy BK. Modelli murini e invecchiamento: longevità e progeria. *Curr Top Dev Biol*. 2014; 109:249–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00003-2> PMID:24947239
30. Pyrkov TV, Avchaciov K, Tarkhov AE, Menshikov LI, Gudkov AV, Fedichev PO. L'analisi longitudinale dei marcatori del sangue rivela la progressiva perdita di resilienza e prevede il limite della durata della vita umana. *Nat Comune*. 2021; 12:2765. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23014-1> PMID:34035236
31. Salminen A, Kauppinen A, Hiltunen M, Kaarniranta K. Gli intermedi del ciclo di Krebs regolano la metilazione del DNA e dell'istone: impatto epigenetico sul processo di invecchiamento. *Aging Delibera Rev*. 2014; 16:45–65. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.05.004> PMID:24910305
32. Runyon NP. *Statistica non parametrica: un approccio contemporaneo*. Società editrice Addison-Wesley. 1977.
33. Ligges U, Maechler M. scatterplot3d - Un pacchetto R per la visualizzazione di dati multivariati. *J Stat Software*. 2003; 8:1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v008.i11>

MATERIALI SUPPLEMENTARI

Tabelle supplementari

Si prega di sfogliare la versione Full Text per vedere i dati della tabella supplementare 2.

Tabella supplementare 1. Caratteristiche dei partecipanti al basale.

	Femmina	Maschio
N	14	28
Etnia (%)		
asiatico	1 (7,1)	1 (3,6)
ispanico/latino	1 (7,1)	1 (3,6)
Bianco/caucasico	12 (85,7)	23 (82,1) 2
Bianco/caucasico, indiano americano o nativo dell'Alaska	0 (0,0) 0	(7,1) 1
Bianco/caucasico, nativo hawaiano o altro isolano del Pacifico	(0,0)	(3,6)
Età cronologica T0 (media (DS))	62,57 (8,11)	61,16 (11,03)
Età cronologica T7* (media (SD))	63,12 (8,11)	61,76 (11,01)
Età biologica T0 (media (SD))	61,09 (7,27)	61,38 (9,64)
Età biologica T7* (media (DS))	54,66 (8,17)	53,53 (8,62)
Consumo settimanale di alcol nelle bevande (%)		
0	5 (35,7)	5 (17,9)
1 a 4	2 (14,3)	10 (35,7) 8
5 a 8	6 (42,9)	(28,6) 5
dalle 9 alle 14	1 (7,1)	(17,9)
Numero attuale di integratori alimentari (%)		
0	2 (14,3)	4 (14,3) 3
1 a 2	4 (28,6)	(10,7) 6
3 a 4	5 (35,7)	(21,4) 15
5	3 (21,4)	(53,6)
Salute generale autovalutata (%)		
Moderare	1 (7,1) 7	1 (3,6)
Bene	(50,0) 6	9 (32,1)
Molto bene	(42,9)	18 (64,3)
Durata del sonno (%)		
4-6 ore	1 (7,1)	2 (7,1)
7-8 ore	13 (92,9)	24 (85,7) 2
Più di 8 ore	0 (0,0)	(7,1)
Storia del fumo (%)		
Fumatore passato ma smesso	3 (21,4)	3 (10,7)
Mai fumatore		
Frequenza di esercizio settimanale (%)		
Raramente	1 (7,1)	0 (0,0)
1-2 volte a settimana	0 (0,0)	5 (17,9)
3+ volte/settimana	7 (50,0)	17 (60,7) 6
Quotidiano	6 (42,9)	(21,4)
BMI (media (DS))	21,84 (2,60)	25,70 (3,97)
Giorni di trattamento (media (DS))	200,57 (35,78)	218,36 (41,57)
Formazione scolastica (%)		
Diploma di scuola superiore (o GED)	1 (7,1) 3	0 (0,0)
Qualche laurea	(21,4) 2	4 (14,3)
universitaria di 4 anni	(14,3) 8	10 (35,7)
Laurea di primo livello	(57,1)	14 (50,0)
Numero medio di pasti giornalieri (%)		
2	6 (42,9)	11 (39,3)

3	7 (50,0)	14 (50,0)
4 o più	1 (7,1)	3 (10,7)
Numero di spuntini giornalieri (%)		
1	6 (42,9)	18 (64,3)
2	6 (42,9)	8 (28,6) 2
3	2 (14,3)	(7,1)
Opinione sugli integratori alimentari (%)		
Scettico	2 (14,3)	3 (10,7)
Nessuna opinione	2 (14,3)	0 (0,0) 4
Interessato	6 (42,9)	(14,3) 21
Fermo credente	4 (28,6)	(75,0)
Frequenza settimanale degli integratori alimentari (%)		
Mai	1 (7,1) 0	0 (0,0)
Raramente	(0,0) 13	1 (3,6)
Quotidiano	(92,9)	27 (96,4)
Mentalità di vita sana (%)		
Pronto per iniziare	1 (7,1)	1 (3,6)
Praticare	10 (71,4)	15 (53,6)
Dedicato	3 (21,4)	12 (42,9)
Livello di attività (%)		
Sedentario	1 (7,1)	2 (7,1)
Moderatamente attivo	2 (14,3)	5 (17,9)
Attivo	5 (35,7)	12 (42,9)
Molto attivo	6 (42,9)	9 (32,1) 0
Atletico	0 (0,0)	(0,0)
Capelli (%)		
Calvo	0 (0,0) 5	4 (14,3)
Diradamento	(35,7) 9	11 (39,3)
Spessa e/o Piena	(64,3)	13 (46,4)

*Indica l'età biologica misurata dal test TruMe dopo una media di sette mesi di trattamento.

Tabella supplementare 2. Modelli di regressione utilizzati (con coefficienti).