

LAVORO ORIGINALE

Effetto scavenger dei lazaroïdi U78517F, U74389F, U74500A sui radicali liberi dell'ossigeno prodotti da polimorfonucleati umani stimolati e mediante metodo chimico

*Scavenging effect of lazaroïds U78517F, U74389F, U74500A
on oxygen free radicals produced by stimulated human polymorphonuclear
leucocytes and by chemical method*

L. Rollo, L. Sabadini, S. Degli Esposti¹, R. Gelli, S. Lorenzini, R. Marcolongo

Istituto di Reumatologia, Università degli Studi di Siena, ¹Pharmacia Italia

SUMMARY

Authors investigated the scavenger capability of lazaroïds, a new group of compounds (21-aminosteroid) that are reported in the literature to have interesting anti-lipid peroxidation properties. Authors tested the degree of scavenger activity related to the oxygen derived free radicals (ODFR) with different methods:

- 1) chemiluminescence;
- 2) production of superoxide anion from activated polymorphonuclear cells;
- 3) production of hydroxyl radical through a chemical procedure.

Results showed a global scavenger activity of the three lazaroïds (U78517F, U74389F, U74500A) in all the various tests, but differences of intensity of their action were noted among in each compound.

We can thus attribute to these compounds a scavenger activity on the oxygen free radicals; this activity may facilitate their already known anti-lipid peroxidation action. Therefore, clinical use of lazaroïds can be hypothesized for the diseases in which inflammation plays an important pathogenetic role via the production of oxygen free radicals and the resulting lipid peroxidation associated with tissue damage.

Reumatismo, 2001; 53(3):223-228

INTRODUZIONE

È dall'inizio degli anni '70 che si è compreso come il nostro organismo produca continuamente radicali liberi e li controlli attraverso una serie di meccanismi di difesa antiossidanti. In condizioni fisiologiche alcuni radicali liberi hanno funzioni utili per il nostro organismo. Quando, però, la generazione di sostanze radicaliche supera la capacità delle difese antiossidanti ne risulta uno stress ossidativo che si evidenzia in molte patologie umane e che talvolta dà un contributo significativo alla loro patogenesi. Le reazioni radicaliche sembrano coin-

volgere una lunga serie di malattie, da quelle infiammatorie-immunitarie a quelle su base ischemica a carico del sistema nervoso centrale, cardiaco e renale (1, 2, 3, 4, 5). Nelle patologie reumatiche, in particolare, è riconosciuto il ruolo dei radicali e della lipoperossidazione nel determinismo della flogosi, di qui l'interesse per lo studio di sostanze capaci di avere un effetto scavenger e anti-lipoperossidante (6, 7, 8, 9). Inoltre lo studio di sostanze già in uso da tempo come antireumatici ha evidenziato un potere scavenger di queste sui radicali liberi dell'ossigeno (RLO) (10). Ci è così sembrata interessante una nuova classe di sostanze, i "lazaroidi", di cui abbiamo voluto valutare le capacità scavenger sui RLO. Sono stati studiati i seguenti lazaroïdi: U74389F e U74500A (21-aminosteroidi) U78517F (aminocromani). Gli aminosteroidi sono un nuovo gruppo di sostanze derivate dai

Indirizzo per la corrispondenza:

Libertario Rollo, Istituto di Reumatologia Policlinico Le Scotte,
53100 Siena,
E-mail Lorenzini@unisi.it

corticosteroidi che non presentano attività glucocorticoide e mineralcorticoide (11). Queste sostanze sono state utilizzate come antilipoperossidanti con risultati brillanti in modelli sperimentali di trauma cranico, emorragia subaracnoidea, stroke e trauma vertebromidollare (12, 13, 14, 15, 16). La capacità scavenger di tali sostanze è stata misurata con un sistema basato sulla produzione chimica di radicali liberi utilizzando spettrometria elettronica paramagnetica di risonanza (17, 18).

Abbiamo analizzato le capacità scavenger dei lazaroidi U74389F, U74500A e U78517F sulla produzione globale dei RLO (chemiluminescenza) o specifica (per l'anione superossido) da PMN umani. Abbiamo valutato anche le specifiche capacità scavenger sul radicale ossidrilico prodotto chimicamente.

MATERIALI E METODI

Per i nostri lavori "in vitro" abbiamo utilizzato tre diversi lazaroidi: U 74389F, U 74500A e U 78517F. Le esperienze condotte hanno preso in esame la valutazione dell'effetto scavenger dei tre lazaroidi a varie concentrazioni e con vari metodi di laboratorio. I principi attivi sono stati forniti dalla Upjohn Italia.

La *chemiluminescenza* (19) è un metodo per valutare l'azione scavenger sul pool dei RLO prodotti da PMN stimolati con zymosan (10 mg ml⁻¹ di tampone fosfato senza Ca²⁺ e Mg²⁺; Sigma) opsonizzato secondo il metodo Bellavite (20), FMLP (6 μM in dimetilsulfossido; Sigma) e PMA (9.6 μM in dimetil sulfossido; Sigma). I PMN sono stati ottenuti da prelievi di sangue venoso periferico di soggetti sani mediante polymorphoprep (Nycomed), che, una volta centrifugato, forma un gradiente di densità sul quale si separano le cellule del sangue.

La purezza (> 90%) e la vitalità (> 95%) della popolazione cellulare sono state verificate mediante l'esame di uno striscio e l'esecuzione del test di esclusione del tripan blue. In seguito ad un'aliquota (100 μl) di una sospensione di PMN, 10⁶ml⁻¹ di PBS, sono stati aggiunti 100 μl di luminolo (2mg in 10 ml di NaOH 0.01M diluito successivamente 1:10 con PBS; Sigma) e 10 μl di ciascuno stimolatore. Il preparato è stato introdotto nel chemiluminometro (Berthold Multi-biolumat LB 9505C) a 37 °C; la cinetica della reazione è stata letta per 40 minuti. L'avvenuta produzione dell'anione superossido (O₂⁻) da parte dei PMN stimolati con FMLP, Zymosan e PMA è stata valutata tramite la riduzione del citocromo-C, come descritto nel metodo di English (21) modificato secondo il metodo

di Bellavite (22). A tale scopo ad un'aliquota di 850 μl di PBS sono stati aggiunti nell'ordine: 100 μl di citocromo-C, 100 μl di stimolatore e 100 μl di sospensione cellulare di PMN. Il preparato è stato incubato per 10 minuti a 37 °C; successivamente si è proceduto all'aggiunta di 50 μl di SOD (superossidodismutasi 75000 unità; Sigma) per fermare la reazione, infine è stata effettuata una centrifugazione per 10 minuti (2000g) a 4 °C e una lettura spettrofotometrica (Beckman DU6) del sovrantante a 550 nm. Il "bianco" è stato preparato introducendo la SOD in un campione prima di tutti gli altri reagenti. I PMN e gli stimolatori sono stati ottenuti nel modo precedentemente descritto.

Un metodo chimico (23) con produzione di *radicale ossidrilico* (OH), ha consentito di studiare l'azione scavenger chimica (in assenza di cellule) dei lazaroidi su questo specifico radicale. Lo sviluppo del radicale ossidrilico viene evidenziato dalla degradazione del desossiribosio per effetto del radicale; il prodotto di degradazione è la malondialdeide che viene quantificata mediante condensazione con l'acido tiobarbiturico. Per ottenere la reazione, ad un'aliquota di 100 μl di 2-desossi-D-ribosio (480 mg 100ml⁻¹; Sigma) sono stati aggiunti 100 μl di farmaco da testare, 500 μl da testare KH₂PO₄ pH 7.4 (4.8 g 100ml⁻¹; Sigma) 250 μl di FeCl₃ (13.5mg 100ml⁻¹; Sigma), 250 μl di acido ascorbico (88.5 mg 100ml⁻¹; Sigma) e 100 μl di H₂O₂ (3%); alla soluzione ottenuta, dopo incubazione a 37 °C per 60 minuti, sono stati aggiunti 1ml di acido tiobarbiturico (1% W/v in NaOH 50 μM; Sigma) e 1ml di acido tricloroacetico (2.8% W/v; Sigma). Si è proceduto quindi, al riscaldamento del preparato a 100 °C per 20 minuti, al raffreddamento in acqua corrente per 10 minuti e alla lettura spettrofotometrica a 532 nm.

Complessivamente per verificare il potere scavenger dei lazaroidi U 74389F, U 74500A e U 78517F, abbiamo comparato i risultati della produzione dei RLO da parte di PMN opportunamente stimolati (zymosan, PMA, FMLP) e da parte del metodo chimico. Le esperienze sono state eseguite in assenza (valore basale) e in presenza dei tre lazaroidi a tre diverse concentrazioni (50, 25 e 0.1 μM). Ogni esperienza è stata ripetuta sei volte, per ciascuna concentrazione delle sostanze testate (il che equivale a dire che sono state effettuate 18 prove per ogni singolo lazaroido testato con un singolo stimolatore per ogni singolo metodo), in modo da permettere una analisi statistica adeguata. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test di Wilcoxon per dati appaiati.

RISULTATI

Nelle tabella I e nelle figure 1, 2, 3 sono riportati i valori di inibizione percentuale in riferimento ad un valore di inibizione 0 rilevato per la produzione basale dei RLO in assenza dei lazaroidei. La valutazione statistica dei dati, mediante la tecnica di analisi della varianza, ha mostrato che le variazioni della produzione dei RLO indotte dalla presenza dei lazaroidei è significativa. L'utilizzazione del test *t* di Student per dati appaiati ha consentito anche la valutazione dell'efficacia dei singoli lazaroidei. I risultati riassunti nelle tabelle mostrano le percentuali di inibizione sulla produzione dei RLO dovute all'azione dei vari lazaroidei alle tre concentrazioni utilizzate e le deviazioni standard. La tabella I riporta i risultati per i tre stimolatori utilizzati in chemiluminescenza, nel test per la produzione dell'anione superossido e sulla produzione del radicale ossidrilico mediante metodo chimico. Nei grafici sono riportate inoltre le significatività risultate dall'applicazione del test *t* di Student per dati appaiati confrontando le percentuali di inibizione dei lazaroidei alle varie concentrazioni rispetto al basale. In particolare è risultato che il lazaroide U78517F è il più potente scavenger in confronto agli altri lazaroidei (U74389F e U74500A), questa sua spiccata capacità inibitoria del burst ossidativo è indipendente dallo stimolo e risulta dose dipendente e questo è stato rilevato sia in chemiluminescenza che col test per la produzione dell'anione superossido; dose dipendente è risultata anche la sua capacità scavenger nei confronti del radicale ossidrilico pro-

dotto con metodo chimico. Il lazaroide U74389F ha mostrato il suo maggior potere scavenger nei confronti dell'anione superossido nel gruppo di cellule stimulate con zymosan e in quello in cui lo stimolatore era rappresentato dal PMA; una buona capacità quenciante è stata anche rilevata nei confronti del radicale ossidrilico; il suo effetto è risultato dose-dipendente. Per il lazaroide U74500A è risultata un'alta percentuale di inibizione nei gruppi di cellule studiate in chemiluminescenza indipendentemente dallo stimolo usato; nel test per la produzione dell'anione superossido la capacità scavenger di questa sostanza è stata rilevata nei campioni stimolati con zymosan ed in quelli stimolati con PMA; anche per questo lazaroide è rimasto essere valido il meccanismo d'azione dose-dipendente che ha dato una certa percentuale di inibizione anche nei confronti del radicale ossidrilico.

DISCUSSIONE

Dai risultati del nostro lavoro si può concludere che i lazaroidei valutati possono bloccare i RLO prodotti da PMN umani stimolati, in maniera significativa e dose dipendente. Questa conclusione risulta vera sia per la produzione globale dei RLO valutate in chemiluminescenza, sia per la produzione specifica di anione superossido e radicale ossidrilico. La letteratura ha dimostrato azioni dei lazaroidei che risultano coerenti con i nostri dati. L'attività di inibizione della lipoperossidazione in modelli animali risulta dimostrata (24, 25). Il danno tissutale polmonare nei

Tabella I

Lazaroidi	Chemiluminescenza			Anione superossido			OH
	Zymosan	PMA	FMLP	Zymosan	PMA	FMLP	met.chim
U78517F % di inibizione							
50µM	56.5	45.9	54.7	29.0	36.4	37.8	63.0
25µM	42.1	32.7	50.1	16.0	28.8	24.8	39.2
0.1µM	1.2	10.3	6.5	3.9	7.0	7.3	13.6
U74389F % di inibizione							
50µM	56.4	11.3	4.0	76.3	76.3	n.i.	31.0
25µM	45.3	n.i.	24.4	62.0	62.0	n.i.	23.3
0.1µM	n.i.	n.i.	n.i.	34.3	26.6	n.i.	3.7
U74500A % di inibizione							
50µM	90.4	49.4	76.2	44.9	36.7	n.i.	22.6
25µM	75.2	63.6	63.8	26.0	23.2	n.i.	14.7
0.1µM	57.1	47.1	36.6	5.1	2.9	n.i.	n.i.
n.i. = non inibizione							

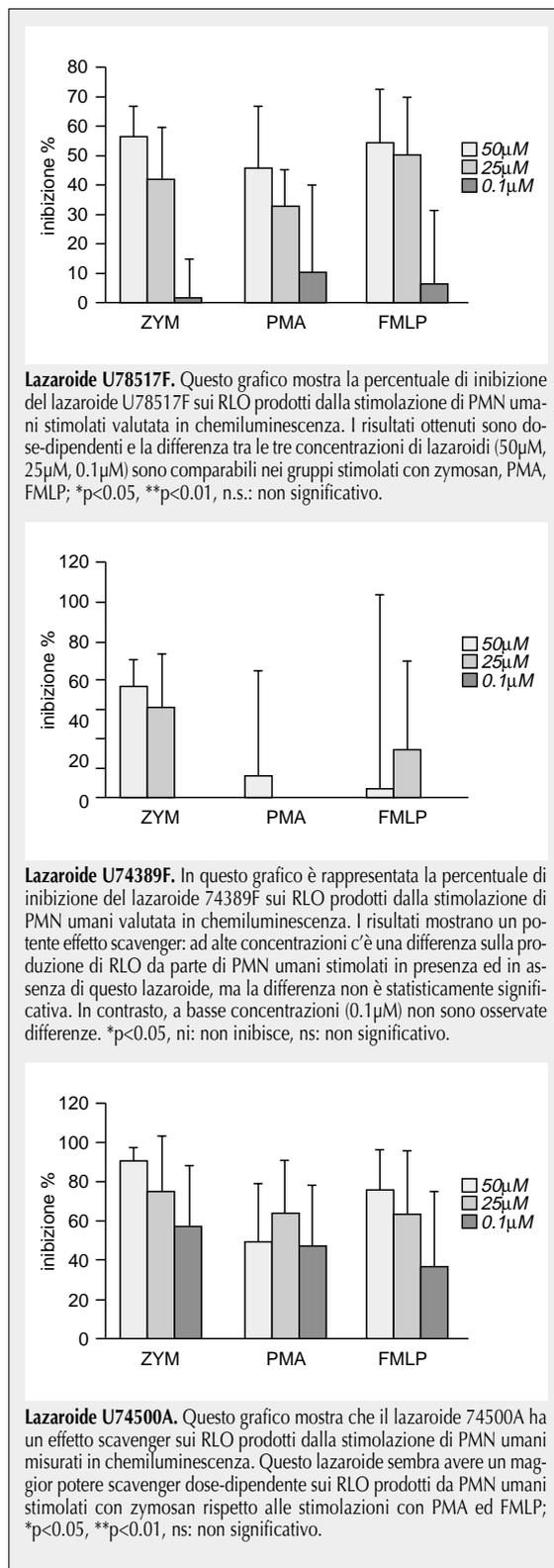


Figura 1 - Chemiluminescente.

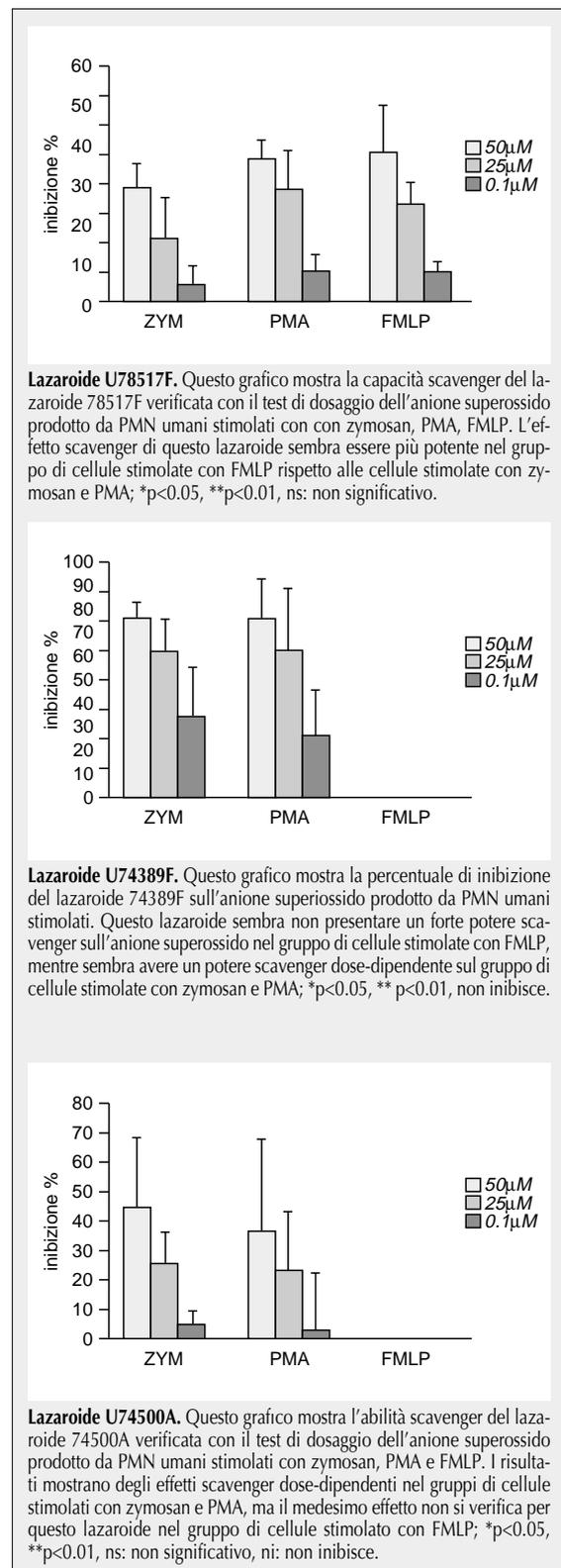


Figura 2 - Azione superossido.

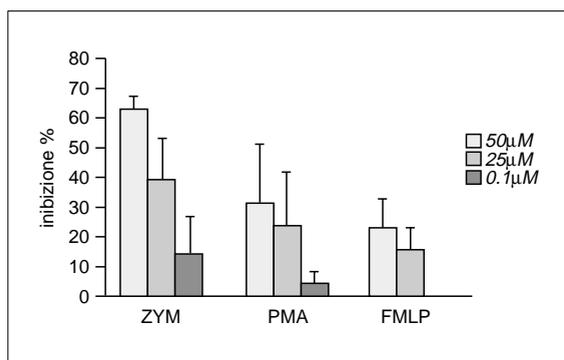


Figura 3 - Metodo dinamico.

Lazaroidi U78517F, U74389F, U74500A. Questo grafico rappresenta le percentuali di inibizione dei lazaroidei U78517F, U74389F, e U74500A sul radicale idrossile prodotto con metodo chimico. Il potere scavenger più elevato è dato dal lazaroide U78517F. La capacità inibente dei tre lazaroidei sul radicale idrossile prodotto è dose dipendente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: non significativo, ni: non inibisce.

ratti che hanno respirato miscele gassose arricchite di ossigeno può essere prevenuto dall'azione di lazaroidei (26). Il danno da riperfusione postischemica del tessuto cardiaco del maiale viene prevenuto dall'impiego dei 21-aminosteroidi (27). Nella letteratura si trovano numerose informazioni riguardo l'effetto antiossidante in vivo e come scavenger di RLO in vitro prodotti da PMN provenienti da animali (28). L'azione citotossica dei cristalli di silice, responsabile della fibrosi polmonare, è mediata dalla produzione di RLO da parte dei macrofagi. I lazaroidei sembrano capaci di impedire l'azione dei cristalli attraverso l'inibizione della lipoperossidazione (29). Nella patogenesi di alcune malattie è dimostrato che l'effetto citotossico dei RLO gioca un ruolo importante. Nella malattia di Alzheimer la neurodegenerazione viene determinata così dalla β -amyloid; in neuroni di colture tessutali è stata determinata l'azione protettiva dei lazaroidei (30). Anche il morbo di Parkinson risulta dovuto alla sofferenza dei neuroni

dopaminergici per l'azione dei RLO; valutazioni *in vitro* hanno potuto mostrare un'azione protettiva dei lazaroidei (31). In colture di cellule beta delle isole pancreatiche sono stati valutati i lazaroidei per il meccanismo di protezione cellulare da radicali liberi; è stato dimostrato ancora che i lazaroidei hanno un'azione scavenger sui RLO ed è stata esclusa una loro azione sul nitrossido (32).

L'originalità del nostro lavoro consiste nella valutazione dell'azione scavenger dei RLO prodotti *in vitro* dai PMN umani del sangue periferico e dalla valutazione dell'azione specifica per il radicale ossidrilico e l'anione superossido. Questa azione dimostrata può avere una valenza importante per l'impiego dei lazaroidei nella terapia di malattie infiammatorie sistemiche come risultano molte malattie reumatiche. Più in generale il nostro lavoro conferma quanto emerge dalla letteratura per una potente azione antiinfiammatoria mediata dalla inibizione della lipoperossidazione. Per quanto riguarda l'attività dei singoli lazaroidei il nostro lavoro, come risulta anche nei vari lavori della letteratura, evidenzia differenze di azione. Il lazaroide U74500A mostra una grande efficacia al test della chemiluminescenza, mentre il U74389F è più efficace sull'anione superossido e il U78517F ha una grande attività contro il radicale ossidrilico. Appare difficile, sulla base di questi risultati in vitro prevedere l'azione terapeutica in vivo; si può comunque sottolineare che il radicale ossidrilico è ritenuto il principale effettore del danno tessutale nella flogosi, potrebbe così essere interessante il lazaroide U78517F per future valutazioni in vivo. Possiamo concludere che questi composti hanno un potenziale terapeutico per numerose patologie in cui la flogosi e la lipoperossidazione innescata dai RLO hanno un importante ruolo patogenetico e per le quali si potrebbe ipotizzare un uso terapeutico per via sistemica e/o locale.

RIASSUNTO

Gli autori hanno voluto indagare le capacità scavenger dei lazaroidei, nuove sostanze proposte in letteratura per l'impiego quali antilipoperossidanti con interessanti potenzialità, sono state valutate le possibilità scavenger sui radicali liberi dell'ossigeno con varie metodiche: chemiluminescenza, produzione di anione superossido (da polimorfonucleati stimolati) e produzione di radicale ossidrilico (mediante un metodo chimico). I risultati hanno mostrato una globale capacità scavenger di tutti i tre lazaroidei (U78517F, U74389F, U74500A) per i vari tests eseguiti, tuttavia sono state notate differenze fra le singole sostanze per l'intensità di questa azione. Si può pertanto riconoscere a queste sostanze una azione scavenger sui radicali liberi dell'ossigeno che si aggiunge all'azione antilipoperossidante e che può contribuire a determinarla. L'impiego clinico dei lazaroidei sembra quindi ipotizzabile per tutte quelle patologie in cui i fenomeni della flogosi trovano un importante valore patogenetico nella produzione di radicali liberi dell'ossigeno e nella conseguente lipoperossidazione con danno tissutale.

Parole chiave: Corticosteroidi, radicali liberi, lazaroidei, stress ossidativo scavenger.

Key words: Corticosteroids, free radicals, lazaroide, oxidative stress, scavenger.

BIBLIOGRAFIA

1. Fligiel SE, Ward PA, Johnson KJ, Till GO. Evidence for a role of hydroxyl radical in immune complex-induced vasculitis. *Am J Pathol* 1984; 155: 375-82.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC, Blake D. Metal ions and oxygen radical reactions in human inflammatory diseases. *Philos Trans R Soc. Lond [Biol]* 1985; 311: 659-71.
3. Komara JS, Nyini NR, Biatick HA, Indrieri RJ, Evans AT, Garritano AM, et al. Brain iron delocalization and lipid peroxidation following cardiac arrest. *Ann Emerg Med* 1986; 15: 384-9.
4. Ratych RE, Bulkley GB. Free radical mediated post-ischemic reperfusion injury in the kidney. *J Free Radic Biol Med* 1986; 2: 311-9.
5. Burrell CJ, Blake DR. Reactive oxygen metabolites and the human myocardium. *Br Heart J* 1989; 61: 4-8.
6. Menander-Huber KB. Orgotein in the treatment of rheumatoid arthritis. *Eur J Rheumatol Inflamm* 1981;4: 201-11.
7. Jimenez RAH, Willkens RF. Dimethyl sulfoxide: a perspective of its use in rheumatic diseases. *J Lab Clin Med* 1982; 100: 489-500.
8. Greenwald RA. Therapeutic benefits of oxygen radical scavenger treatment remain unproven. *J Free Radic Biol Med* 1985; 1: 173-7.
9. Rice-Evans CA, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. *J Free Radic Biol Med* 1993; 15: 77-96.
10. Minta JO, Williams MD. Some nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the generation of superoxide anions by activated polymorphs by blocking ligand-receptor interactions. *J Rheumatol* 1985; 12: 751-7.
11. Braugher J Chase RL, Neff GL, Day JS, Yonkers PA, Hall ED, et al. A new 21aminosteroid antioxidant lacking glucocorticoid activity stimulates ACTH secretion and blocks arachidonic acid release from mouse pituitary tumor (AtT-10) cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244: 423-7.
12. Hall ED, Yonkers PA, McCall J Braugher JM. Effects of the 21-aminosteroid U74006F on experimental head injury in mice. *J Neurosurg* 1988; 68: 456-61.
13. Holtz A, Gerdin B. Efficacy of the U74006F in improving neurological recovery after spinal cord injury in rats. *Neurol Res* 1992; 14: 49-52.
14. Wilson JT, Beduar MM, McAuliffe TL, Raymond S, Grosa CE, Mayberg MR, et al. The effect of the 21-aminosteroid U74006F in a rabbit model of thromboembolic stroke. *J Neurosurgery* 1992; 31: 829-34.
15. Zuccarello M, Marsch JT, Schmitt G, Woodward J, Anderson DK. Effect of the 21aminosteroid U74006F on cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1989; 71: 98-104.
16. Clark WM, Hazel JS, Coull BM. Lazaroids. *CNS pharmacology and current research. Drugs* 1995; 50: 971-83.
17. Zhao W, Richardson JS, Mombourquette MJ, Weil JA. An in vitro EPR study of the freeradical scavenging actions of the lazaroid antioxidants U-74500A and U-78517F. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 21-30.
18. Yoshioka T, Iwamoto N, Ito K. An application of electron paramagnetic resonance to evaluate nitric oxide and its quenchers. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 961-5.
19. De Luca MA, McElroy WD. Bioluminescence and chemiluminescence. *Methods in Enzymol* 1986; 133: 449-93.
20. English D, Roloff JS, Lukens JN. Regulation of human polymorphonuclear leucocyte superoxide release by cellular response to chemotactic peptides. *J Immunol* 1981; 126: 165-71.
21. Bellavite P, Dri P, Berton G, Zabucchi G: Un nuovo test di funzionalità fagocitaria basato sulla misura della produzione di anione superossido (O₂) *Lab J Res Lab Med* 1980; 1: 67-9.
22. Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge JMC. Methods of the measurement of hydroxyl radical in biochemical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods Biochem Anal* 1988; 33: 59-90.
23. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Clarendon Press, Oxford, 1989.
24. Tanaka H, Zhu Y, Zhang S, Ishizaki N, Jin MB, Azuma T, et al. Lazaroids U-74500A for warm ischemia and reperfusion injury of the canine small intestine. *J Am Coll Surg* 1997; 184: 389-96.
25. Shizaki N, Zhu Y, Zhang S, Nemoto A, Kobayashi Y, Subbotin V, et al. Comparison of various lazaroid compounds for protection against ischemic liver injury. *Transplantation* 1997; 63: 202-8
26. Griffn RL, Krzesicki RF, Fidler SF, Rosenbloom CL, Auchampach JA, Manning AM, et al. Attenuation of oxidant induced lung injury by 21-aminosteroids (lazaroids): correlation with the mRNA expression for E-selectin, P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 10: 193-200
27. Nedani C, Perna AM, Liguori P, Formigli L, Ibba-Manneschi L, Zecchi-Orlandini S, et al. Beneficial effects of the 21-aminosteroids U-74389G on the ischemia-reperfusion damage in pig hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2825-35.
28. Kalra J, Mantha SV, Kumar P, Prasad K. Protective effects of lazaroids against oxygen free radicals induced lysosomal damage. *Mol Cell Biochem* 1994; 136: 125-29.
29. Huang SH, Leonard S, Shi X Goins MR, VaJlyathan V. Antioxidant activity of Lazaroids (U-75412E) and its protective effects against crystalline silica-induced cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 529-36
30. Richardson JS, Zhou Y, Kumar U. Free radicals in the neurotoxic actions of beta-amyloid. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 777: 362-7.
31. Karlsson J, Emgard M, Rosenblad C, Brundin P. Treatment with the spin-trap agent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron does not enhance the survival of embryonic or adult dopamine neurons. *Brain Res* 1998; 805: 155-68.
32. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Lakey JR, Rajotte RV. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radical aldehyde production. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 3197-202.