



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE "A. AVOGADRO"

**VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI ANTI-INFIAMMATORI
DI MOLECOLE NO-DONATRICI
IN MONOCITI E MACROFAGI UMANI**

XXV Ciclo di Dottorato in Medicina Molecolare

Tutor: Prof.ssa Sandra Brunelleschi

Dottorando: Dott.ssa **Donata Federici Canova**

INTRODUZIONE

Il radicale libero ossido nitrico o nitrossido (NO) rappresenta un'importante molecola che, fin dalla sua scoperta, ha raccolto grande interesse nella comunità scientifica. Nonostante la sua semplice struttura chimica, l'azione biologica dell'NO è complessa e coinvolge il sistema cardiovascolare, il sistema nervoso centrale e periferico, il sistema immunitario, respiratorio e gastrointestinale (Feelish et al., 2008). Agli inizi degli anni '80, utilizzando un modello sperimentale di arterie isolate da coniglio, Furchgott e Zawadzki osservarono che l'Acetilcolina, in presenza di cellule endoteliali integre, induceva il rilassamento dei vasi, mentre in assenza dell'endotelio causava vasocostrizione per stimolazione diretta delle cellule muscolari lisce sottostanti. Essi ipotizzarono, quindi, che esistesse una sostanza prodotta dalle cellule endoteliali ad azione vasodilatatrice, che chiamarono EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor) (Furchgott & Zawadzki, 1980). In seguito, altri studiosi documentarono che l'EDRF corrispondeva all'NO, in quanto ne condivideva le caratteristiche farmacologiche e determinava gli stessi effetti sulle cellule bersaglio (Ignarro et al., 1987). I maggiori e più importanti contributi nella ricerca sull'NO si devono a Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad, insigniti nel 1998 del Premio Nobel per la Medicina *"for their discoveries concerning nitric oxide as a signalling molecule in the cardiovascular system"*. È stato chiarito, inoltre, che a livello intracellulare l'NO si lega al gruppo eme dell'enzima guanilato ciclastasi solubile (sGC) e ne provoca l'attivazione con il conseguente rilascio di cGMP responsabile, a sua volta, degli effetti a valle, tra cui il rilassamento delle cellule muscolari lisce. Il cGMP interagisce con specifici siti di legame presenti su proteine bersaglio, tra cui protein-chinasi, fosfodiesterasi e canali ionici (Lucas et al., 2000). Esistono, inoltre, effetti dell'NO non mediati da cGMP, tra cui modificazioni post-traduzionali (es. nitrosilazione di residui di cisteina) od ossidazione di biomolecole che influenzano l'attività di numerosi enzimi e fattori di trascrizione (ad esempio NF- κ B, *Nuclear Factor- κ B*) (Stamler et al., 2001; Colasanti & Suzuki, 2000). L'NO è sintetizzato da diversi tipi cellulari, come ad esempio cellule endoteliali, immunitarie e neuronali, durante la conversione della L-Arginina in L-Citrullina per azione degli enzimi nitrossido-sintasi (NOS). Esistono tre distinte isoforme di NOS: due di esse sono espresse costitutivamente e sono presenti a livello neuronale (Neuronal-NOS, nNOS) ed endoteliale (Endothelium-NOS, eNOS), mentre l'espressione della terza isoforma (Inducibile-NOS, iNOS) è indotta da stimoli infiammatori e causa un rapido e significativo aumento di NO all'interno della cellula (Tripathi et al., 2007). Un aspetto importante dell'NO è che la sua azione biologica può essere sia benefica che dannosa per l'organismo, in relazione alla sua localizzazione e quantità. In condizioni fisiologiche, l'espressione costitutiva di nNOS ed eNOS garantisce una costante e bassa concentrazione (nell'ordine di pico/nanomoli) di NO. In tale contesto, l'NO media processi

protettivi per l'organismo: a livello cardiovascolare, esso ha infatti effetto anti-trombotico e anti-aterosclerotico, promuovendo la vasodilatazione, inibendo l'attivazione e l'aggregazione piastrinica e la migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce. A livello gastrointestinale, l'NO regola la peristalsi, aumenta il flusso sanguigno e la secrezione della mucosa gastrica, aiutando così la rigenerazione tissutale in caso di lesioni; a livello immunitario inibisce l'adesione e il rilascio di citochine e di mediatori flogistici da parte dei leucociti. In condizioni patologiche, l'esposizione delle cellule ad endotossine batteriche (Lipopolisaccaride, LPS) o citochine pro-infiammatorie quali Interleuchina-1 (IL-1), Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), induce l'espressione e l'attività di iNOS con il successivo rilascio di alte concentrazioni di NO, necessarie per aumentare la permeabilità vascolare e l'infiltrazione leucocitaria al sito d'infiammazione (Miller & Megson, 2007). Inoltre, iNOS media l'azione battericida e tumoricida delle cellule immunitarie (Nathan, 1997; Weigert & Brune, 2008). Tuttavia, alti persistenti livelli di NO sono citotossici, in quanto, in particolari condizioni di stress ossidativo, NO può reagire con l'anione superossido (O_2^-) per formare composti altamente tossici come il perossinitrito ($ONOO^-$) e radicali ossidrilici (Moncada & Higgs, 1993; Colasanti & Suzuki, 2000; Bryan et al., 2009).

L'apporto dall'esterno di NO, a fini terapeutici, ha suscitato molto interesse. Molecole NO-donatrici sono impiegate da tempo, e assai prima della scoperta dell'NO, per esempio nel trattamento dell'angina o dell'ipertensione polmonare, con l'utilizzo della nitroglicerina (GTN) o dell'isosorbide monoidrato (ISMN) (Marik & Varon, 2009; Parker & Parker, 1998). Recentemente, sono stati studiati e sviluppati farmaci coniugati con un gruppo donatore di NO. Lo scopo di questa strategia è di sintetizzare composti che mantengano le proprietà farmacologiche dei farmaci di origine con l'aggiunta delle attività biologiche dell'NO. Tra questi, rivestono particolare interesse le statine- e farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS)-NO donatori, di cui mi sono occupata nell'ambito del mio progetto di dottorato.

Molti studi riguardanti l'azione biologica dell'NO si sono focalizzati sulle disfunzioni endoteliali implicate nello sviluppo di un vasta gamma di rischi per il sistema cardiovascolare, incluso aterosclerosi, insufficienza cardiaca, diabete, ipertensione e ipercolesterolemia (Vanhoutte et al., 2009; Michel & Vanhoutte, 2010). Nell'ambito di quest'ultima condizione, strettamente associata allo sviluppo di aterosclerosi, gli inibitori della 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reduttasi, ovvero le statine, sono la classe di farmaci più utilizzati, in quanto impediscono la conversione dell'HMG-CoA in acido mevalonico, precursore del colesterolo, i cui alti livelli ematici rappresentano un importante rischio cardiovascolare. Tuttavia, è stato osservato che anche in soggetti con livelli normali di colesterolo il trattamento con statine riduce il rischio cardiovascolare, suggerendo l'esistenza di meccanismi distinti dalla riduzione di colesterolo, i cosiddetti effetti pleiotropici delle statine (Heart Protection Study Collaborative Group, 2002). Tra questi, rivestono significativa importanza l'azione anti-infiammatoria, anti-proliferativa e anti-trombotica conseguente

all'aumento di sintesi di NO da parte delle cellule endoteliali, indotto dalle stesse statine (Laufs et al., 1998; Wu, 2002). Il ruolo anti-infiammatorio delle statine è stato dimostrato in diversi studi utilizzando linee cellulari di monociti/macrofagi, nelle quali inibiscono l'espressione della ciclo-ossigenasi 2 (COX-2) indotta da LPS, il rilascio di prostanoidi e la traslocazione ed attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, mentre aumentano l'attivazione del recettore nucleare PPAR- γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ*) implicato nella inibizione dell'attivazione dei monociti e del rilascio di mediatori infiammatori (Habib et al., 2007; Yano et al., 2007). Pertanto, lo sviluppo di composti che combinano le proprietà delle statine con quelle delle molecole a lento rilascio di NO, potrebbe apportare un valore terapeutico supplementare, specialmente per quelle patologie, come il diabete e l'aterosclerosi, nelle quali un impoverimento delle funzioni endoteliali causa l'impossibilità di produrre sufficienti quantità di NO e, in ultimo, contribuisce alla progressione della malattia. L'azienda *NicOx Research Institute Srl*, fondata nel 1999 e da tempo impegnata nel settore delle molecole "NO-donors", ha sviluppato, a livello preclinico, alcune nitrostatine. In particolare, coniugando la pravastatina e la fluvastatina con molecole NO-donatrici, ha ottenuto i due composti NCX-6550 (nitro-pravastatina) e NCX-6553 (nitro-fluvastatina), che presentano maggiore lipofilia ed aumento dell'attività anti-proliferativa ed anti-infiammatoria rispetto alle statine native.

Ongini et al. (2004) hanno documentato che le NO-statine aumentano, in maniera tempo-dipendente, la concentrazione di nitrosil-emoglobina nel sangue di ratto, e ciò è in accordo con una cinetica a lento rilascio di NO. Le statine NO-donatrici sono, inoltre, significativamente più efficaci rispetto ai composti di origine nell'inibire la proliferazione delle cellule muscolari lisce in arterie isolate da ratto. Infine, in linee cellulari macrofagiche murine (RAW 264.7) stimulate con LPS, le statine NO-donatrici, ma non le statine di origine, causano una significativa diminuzione dell'espressione di iNOS e di COX-2, confermando quindi la loro azione anti-infiammatoria (Ongini et al., 2004). Successivi studi hanno dimostrato che NCX-6550 possiede attività anti-trombotica, sia *in vitro* che *in vivo*, bloccando l'attivazione piastrinica e inibendo l'espressione del fattore tissutale (Rossiello et al., 2005), e stimola il processo angiogenetico, migliorando il recupero dopo un evento ischemico in topi diabetici di tipo1 (Emanuelli et al., 2007). Ancora, la nitro-pravastatina riduce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sia in modelli murini di aterosclerosi che nei controlli (Dever et al., 2007) e, in ultimo, esercita effetti cardio-protettivi in modelli murini di infarto del miocardio (Di Filippo et al., 2010). Collettivamente, questi risultati indicano che l'incorporazione nella pravastatina di un gruppo donatore di NO può effettivamente apportare vantaggiosi effetti biologici rispetto al farmaco originale, quali miglioramento della funzione endoteliale e riduzione di marcatori infiammatori.

Gli anti-infiammatori non steroidei (FANS) sono la classe di farmaci più utilizzata in un'ampia varietà di condizioni infiammatorie e spesso rappresentano la prima scelta terapeutica nelle

patologie croniche infiammatorie. I FANS inibiscono l'enzima ciclo-ossigenasi (COX), che trasforma l'acido arachidonico in prostaglandine (PG), prostaciclina (PC) e trombossano (TX) A₂, molecole coinvolte nel processo infiammatorio. L'enzima COX esiste in due forme: COX-1, prodotta costitutivamente ed ubiquitaria in condizioni fisiologiche, e COX-2, sintetizzata in maniera inducibile in condizioni infiammatorie (Bertolini et al., 2001). Come noto, l'uso prolungato dei FANS è associato ad importanti effetti collaterali, soprattutto a livello gastrointestinale; infatti, i FANS non selettivi, inibendo entrambe le isoforme enzimatiche di COX, riducono la risposta infiammatoria (dovuta a COX-2) interferendo però negativamente con il mantenimento dell'omeostasi della mucosa gastrica (sostenuta da COX-1) e, inoltre, stimolano l'adesione dei leucociti all'endotelio aumentando le probabilità di sviluppare lesioni (Wallace et al., 1994). Non sorprende, quindi, che numerosi studi abbiano esplorato possibili strategie volte a prevenire il danno gastrointestinale da FANS. Il primo approccio è stato quello di sviluppare inibitori selettivi per COX-2, i cosiddetti COXIBs (*cyclooxygenase-2 inhibitors*) che mantengono l'attività inibitoria sulla sintesi di prostaglandine "infiammatorie" ma non interferiscono con l'attività di COX-1, soprattutto a livello gastrico. Nonostante ciò, questi FANS COX-2 specifici inducono un'importante tossicità gastrointestinale. Una possibile strategia alternativa è quella di sviluppare FANS coniugati a molecole donatrici di NO. Infatti, come già discusso in precedenza, l'ossido nitrico, così come le prostaglandine, ha effetti protettivi verso la mucosa gastrica (Miller & Megson, 2007). In generale, i FANS NO-donatori conservano le proprietà farmacologiche dei composti d'origine, ma hanno significativi vantaggi derivanti dalla coniugazione con NO e con una molecola spaziatrice interposta, che conferisce, a seconda della sua natura, differenti cinetiche di rilascio di NO. Alcuni dei primi composti sintetizzati con questa strategia sono state le nitro-aspirine (NCX-4016 e NCX-4215): questi farmaci mantengono le proprietà anti-infiammatorie e analgesiche dell'aspirina, senza tuttavia causare effetti lesivi sulla mucosa gastrica. Inoltre, NCX-4016 e NCX-4215 conservano gli effetti anti-aggreganti sulle piastrine senza causare eccessiva vasodilatazione o ipotensione (Burgaud et al., 2002; Wallace & Del Soldato, 2003). Anche il flurbiprofene e il Naprossene sono stati modificati grazie alla coniugazione con molecole a rilascio di NO. In particolare, NCX-429, rappresenta il primo composto di una nuova classe di farmaci, i *cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide (NO) donators* (CINODs), sintetizzato dalla *NicOx Research Institute Srl*: esso combina l'azione del Naprossene con quelle derivanti dal rilascio di NO. È stato dimostrato che, in modelli animali di artrite, NCX-429 conserva le proprietà anti-infiammatorie e analgesiche del farmaco originale, ma possiede una minor tossicità a livello gastrointestinale (Cuzzolin et al., 1995; Davies et al., 1997). A livello cardiovascolare NCX-429, metabolizzato a Naprossene ed NO, ha effetto vasodilatatore, come dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* in modelli animali, confermando così le sue proprietà cardio-protettive (Wallace et al., 2009). Per tali ragioni, NCX-429 potrebbe rappresentare una valida opzione terapeutica nel caso di malattie che

richiedono trattamenti prolungati nel tempo, come ad esempio nell'artrite reumatoide e nell'osteoartrite (Geusens, 2009).

L'obiettivo del mio primo anno di dottorato è stato quello di valutare gli effetti anti-infiammatori della nitro-pravastatina NCX-6550 e del nitro-Naprossene NCX-429, forniti dalla *NicOx Research Institute Srl*, (Milano, Italia), su monociti e macrofagi che, come noto, rivestono un importante ruolo nei processi infiammatori e in patologie croniche. Queste cellule rappresentano, inoltre, un interessante modello per valutare gli effetti di farmaci NO-donatori. Infatti, a differenza delle linee murine, i monociti/macrofagi umani, nonostante esprimano sia il messaggero che la proteina iNOS, liberano livelli molto bassi o addirittura nulli di NO, anche in seguito a stimolazione *in vitro* (Albina, 1995; Weinberg et al., 1995).

Gli effetti anti-infiammatori di NCX-6550 e NCX-429 sono stati confrontati con quelli dei farmaci d'origine (pravastatina e Naprossene), con "NO-donors" di uso clinico, quali l'isosorbide mononitrato (ISMN) e il sodio nitroprussiato (SNP), con altre molecole NO-donatrici, ad es. NCX-1351 (isomero R di NCX-429 che ne mantiene la parte NO-donatrice senza attività su COX), con R-Naprossene (R-Nap, isomero R del Naprossene, inattivo su COX) e con agonisti di PPAR- γ , quali il rosiglitazone e la 15-deossi-prostaglandina J₂ (15d-PGJ).

E' stata valutata, quindi, la capacità dei vari composti di interferire con meccanismi infiammatori, quali il rilascio di citochine, la produzione di anione superossido (O₂⁻), l'espressione del recettore PPAR- γ e la traslocazione di NF- κ B.

MATERIALI E METODI

Isolamento di monociti (M) e Monocyte-Derived Macrophages (MDM) da volontari sani

I monociti (M) sono stati isolati da sangue venoso eparinizzato. Il sangue prelevato viene fatto sedimentare con una soluzione di destrano in rapporto 1:1 e centrifugato a 400g per 30' a temperatura ambiente su gradiente di Hystopaque (densità=1.077 g/cm³). L'anello di cellule mononucleate viene trasferito in un altro tubo e lavato con PBS (phosphate-buffered saline pH 7.4) per 10' a 250g per tre volte; le cellule così recuperate vengono piastrate in RPMI 1640 medium, con l'aggiunta di siero fetale bovino (FBS, scomplementato) al 5%, 2 mM di glutammina, 50 µg/ml di streptomicina, 5 U/ml di penicillina e 2.5 µg/ml di amfotericina B (Brunelleschi et al., 1998). La popolazione purificata di monociti viene ottenuta per adesione (90', 37°C, 5% CO₂) e le cellule in sospensione (principalmente linfociti) vengono rimosse con tre lavaggi di PBS; la vitalità cellulare viene valutata con "trypan blue dye exclusion" ed è normalmente > 98% (Brunelleschi et al., 1998). Attraverso la citofluorimetria sono stati valutati diversi marker di superficie che hanno permesso di appurare che fosse una popolazione pura di monociti (> 90% CD14⁺, < 2% CD3⁺). I *Monocyte-Derived Macrophages* (MDM) sono ottenuti da monociti incubati a 37°C per 8-10 giorni con RPMI 1640 completo con l'aggiunta del 20% di FBS, con cambi di terreno ogni 2-3 giorni. Gli MDM vengono considerati cellule "macrophage-like", grazie alla diminuzione dei marker di superficie CD14 (soltanto il 25-30% degli MDM sono CD14) ed all'assenza dell'espressione del marker CD1a che dimostra che nelle preparazioni di MDM non ci sono cellule che si stanno differenziando in cellule dendritiche (Amoruso et al., 2008).

Valutazione della tossicità cellulare

Al fine di valutare la tossicità cellulare dei composti in studio, 1x10⁵ monociti sono stati piastrati e stimolati con la massima concentrazione di molecole NO-donatrici per 6 e 24 ore. Il terreno di coltura è stato poi recuperato e sostituito con una soluzione di MTT 1mg/ml (Metiltiazolildifeniltetrazolio bromide, Sigma). Dopo 2 ore di incubazione a 37°C, al riparo della luce, la soluzione di MTT è stata rimossa ed è stato aggiunto DMSO (Dimetilsolfossido) per dissolvere i precipitati di formazano, formatosi in presenza di cellule vitali. L'assorbanza dei campioni è stata letta a 580 e 675 nm. Tutti i composti utilizzati (NCX-6550, pravastatina, NCX-429, Naprossene, 15d-PGJ, Rosiglitazone, ISMN, SNP, NCX-1351, R-NAP) alla massima concentrazione, non riducono la sopravvivenza cellulare.

Produzione di nitriti e di anione superossido

Il contenuto di nitriti/nitrati è stato valutato in 100µl di terreno di cultura attraverso la reazione colorimetrica Griess, utilizzando il kit "Griess Reagent System" (Promega, Madison, USA), secondo le specifiche dell'azienda. Dato che i monociti rilasciano livelli molto bassi di NO (Albina JE, 1995), sono state utilizzate linee macrofagiche murine (RAW 264.7) come controllo positivo interno. In breve, 1×10^5 cellule sono state pre-trattate per 30' con le molecole NO-donatrici alla massima concentrazione e successivamente stimulate con PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato) o LPS per 30' o 24 ore. Il PMA è stato usato ad una concentrazione di 10^{-6} M (30') o 10^{-7} M (24 ore), mentre l'LPS è stato usato a 100 ng/ml (30') o 10 ng/ml (24 ore). Questi due "time-point" sono stati selezionati in accordo a Bardelli et al. (2005) e rappresentano i tempi ottimali per ottenere la massima produzione di anione superossido (30') e il massimo "release" di citochine (24 ore) nei monociti/macrofagi umani.

La valutazione della produzione di anione superossido (O_2^-) è stata fatta su 1×10^6 cellule (monociti/MDM e RAW 264.7) stimulate, in assenza o presenza di molecole-NO donatrici, con PMA 10^{-6} M o LPS 100 ng/ml per 30', misurando la riduzione, superossido-dismutasi (SOD)-sensibile, del citocromo C presente nel medium. Tale reazione induce un cambiamento di assorbanza nei campioni, letta in spettrofotometria a 550 nm. La produzione di O_2^- è stata espressa come nmoli citocromo C ridotto/ 10^6 cellule/30 min, usando un coefficiente di estinzione di 21.1 mM (Bardelli et al., 2005). Per evitare interferenze con la lettura dell'assorbanza, le cellule sono state incubate con terreno RPMI 1640 senza rosso fenolo, antibiotici e FBS.

Rilascio di citochine

Il rilascio di citochine è stato misurato utilizzando il kit *Pelikine CompactTM human ELISA*. Le cellule sono state pre-trattate con gli NO-donatori e con gli agonisti di PPAR- γ (15d-PGJ e Rosiglitazone), per 1 ora e successivamente stimulate con PMA 10^{-7} M per 24 ore. In seguito, i surnatanti sono stati raccolti e congelati a -80°C . Le citochine analizzate sono state TNF- α , IL-6 e IL-10 (quest'ultima anti-infiammatoria) e i risultati sono stati espressi in pg/ml.

Espressione proteica di PPAR- γ nei monociti/macrofagi e analisi semiquantitativa

L'espressione proteica di PPAR- γ nei monociti/macrofagi è stata valutata con Western blot. Le cellule sono analizzate sia in condizioni basali che dopo trattamento con i composti NO-donatori e con ligandi di PPAR- γ (15d-PGJ e Rosiglitazone) per 6 ore (Amoruso et al., 2008). Le cellule sono state inizialmente lavate due volte con PBS freddo e staccate in tampone di lisi (0,1% SDS, Hepes 50 mM ph 7.4, NaCl 150mM, 1% Triton, 1% Deossicolato, 10% Glicerolo, EGTA 1mM, $MgCl_2$ 1.5mM, NaF 1mM e 1 mM PMSF, fenil-metil-sulfonil-fluoruro). Le cellule lisate sono state sottoposte a *shock* termico. Il dosaggio proteico è stato fatto con metodo BCA; 30 µg di proteina

sono stati separati con SDS-PAGE (10% acrilamide) e trasferiti su membrane di nitrocellulosa. Gli *immunoblots* sono stati eseguiti con metodiche standard utilizzando i seguenti anticorpi: anticorpo primario monoclonale anti-PPAR- γ (Santa Cruz 1:1000 e Abcam 1:400 in TBS-Tween 5% latte), anticorpo primario monoclonale anti- β -actina (Sigma; 1:5000 in TBS-Tween 3% BSA), scelta come *proteina di controllo ed* anticorpi secondari *anti-mouse* o *anti-rabbit* coniugati con perossidasi (Amersham Biosciences). Le proteine sono state visualizzate in chemiluminescenza (ECL, Perkin Elmer), il cui segnale è stato analizzato con un densitometro in condizioni non saturanti (Versadoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La valutazione semi-quantitativa di PPAR- γ è stata espressa come rapporto tra la sua espressione proteica e quella della β -actina.

Isolamento dell'RNA e Real-Time PCR

L'RNA totale è stato estratto dai monociti con *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit* (Sigma), e la purezza e la quantità di RNA totale è stata valutata con metodo spettrofotometrico (260-280 nm). La sintesi del cDNA è stata eseguita con *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystem; Carlsbad, CA). Le cellule sono state stimulate con gli NO-donatori e con i ligandi di PPAR- γ , 15d-PGJ e Rosiglitazone, per 2 ore. Sono stati successivamente caricati 4 μ l di cDNA in piastre da 96 pozzetti (*Optical Reaction Plates*; Applied Biosystem) con 1 μ l di *TaqMan Expression Assay* (PPAR- γ), 5 μ l RNasi free water, 10 μ l *TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)*. I campioni sono stati analizzati con *Applied Biosystem 7000 ABI Prism System*. Il gene di controllo endogeno usato per la normalizzazione è la β -glucuronidasi. I risultati sono stati analizzati attraverso la comparazione dei cicli-soglia, in accordo con il metodo Livak e Schmittgen (Livak KJ and Schmittgen TD, 2001).

Attivazione di NF- κ B

L'attivazione di NF- κ B è stata valutata tramite *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA), pre-trattando le cellule per 30' con gli NO-donatori e successiva stimolazione con PMA 10^{-6} M per 1 ora (tale tempistica permette la massima attivazione del fattore di trascrizione, così come osservato in precedenti esperimenti; Lavagno et al., 2004). Gli estratti nucleari sono stati ottenuti utilizzando il "*Nuclear extraction kit*" (Active Motif, Rixensart, Belgium); 5 μ g di estratto sono stati incubati con 2 μ g di poly (dI-dC) e una sonda di DNA marcata con γ^{32} P-ATP specifica per NF- κ B (100,000-150,000 cpm; Promega, St Louis, U.S.A.) nell'opportuno *binding buffer*. Dopo l'ibridazione il campione è stato fatto correre su gel nativo di poliaccrilamide al 5%. Il gel è stato successivamente essiccato e le bande radioattive visualizzate attraverso auto-radiografia (Bardelli et al., 2005). Il *supershift* è stato eseguito con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, USA).

VALUTAZIONE DI NCX-6550

Effetto dell'NCX-6550 sulla produzione di nitriti e di anione superossido

Le cellule, sia monociti che RAW 264.7, sono state pre-incubate con NCX-6550 ad una concentrazione di 50 μ M per 30', e poi stimolate con PMA o LPS per altri 30' o 24 ore. Nelle RAW 264.7, PMA e LPS inducono un accumulo di nitriti (molecole prodotte dal metabolismo di NO) solo dopo 24 ore di stimolazione. In accordo con dati precedenti (Ongini et al., 2004), NCX-6550 inibisce l'accumulo di nitriti nelle linee cellulari murine stimolate per 24 ore. I monociti, in condizioni basali, rilasciano bassi livelli di nitriti confermando i dati in letteratura (Albina, 1995). In queste cellule, il trattamento con NCX-6550 causa un significativo aumento di nitriti rispetto al controllo dopo 30' ($p < 0,05$), mentre il PMA determina un significativo aumento di nitriti sia dopo 30' che dopo 24 ore ($p < 0,05$ vs controllo) (Fig. 1). Ciò suggerisce che, nei monociti, il PMA induce la sintesi *de novo* dell'enzima iNOS e, conseguentemente, l'accumulo di nitriti nel medium cellulare, così come dimostrato in altri tipi cellulari (Tepperman et al., 2000). Inoltre, NCX-6550 (ma non la pravastatina 50 μ M; non riportato) inibisce l'accumulo di nitriti sia nelle RAW 264.7 (stimolate con PMA o LPS per 24 ore) che nei monociti stimolati con PMA (Fig 1).

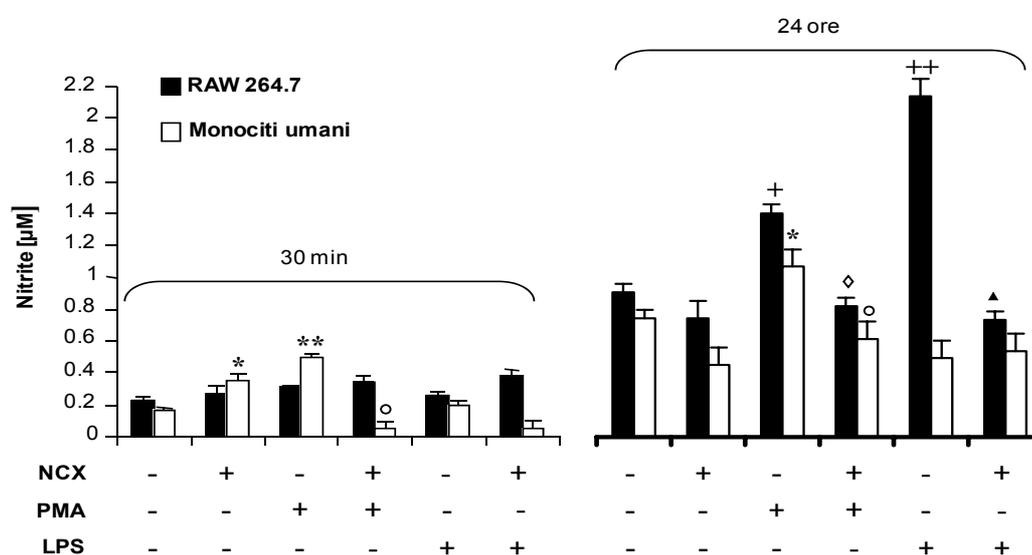


Fig.1 Effetto di NCX-6550 sull'accumulo di nitriti. I valori sono espressi come media \pm s.e.m. * $p < 0.05$ vs CTR monociti, ** $p < 0.01$ vs CTR monociti, ° $p < 0.05$ vs monociti stimolati con PMA, + $p < 0.05$ vs CTR RAW 264.7, ++ $p < 0.01$ vs CTR RAW 264.7, ◊ $p < 0.05$ vs RAW 264.7 stimolate con PMA, ▲ $p < 0.05$ vs RAW 264.7 stimolate con LPS .

Poiché i monociti/macrofagi umani producono importanti quantità di ROS in condizioni infiammatorie, abbiamo verificato la capacità di NCX-6550 di interferire con la produzione di anione

superossido (O_2^-). Come riportato in Fig 2, nelle cellule RAW 264.7 non vi è un significativo *burst respiratorio*, a differenza di quanto accade nei monociti. Nei monociti, infatti, la stimolazione con PMA (ma non con LPS) determina un significativo aumento ($p < 0,001$ vs controllo) nella produzione di O_2^- (Fig.2). NCX-6550, alla concentrazione di 50 μM riduce, di circa l'80%, la produzione di ROS indotta da PMA ($p < 0,01$), mentre la pravastatina (50 μM) riduce del 55% e il Sodio Nitroprussiato (SNP) è meno efficace. E', infine, interessante notare come l'NCX-6550, ma non gli altri due composti, riduca la generazione di O_2^- anche alla concentrazione di 1 μM (Tab. 1).

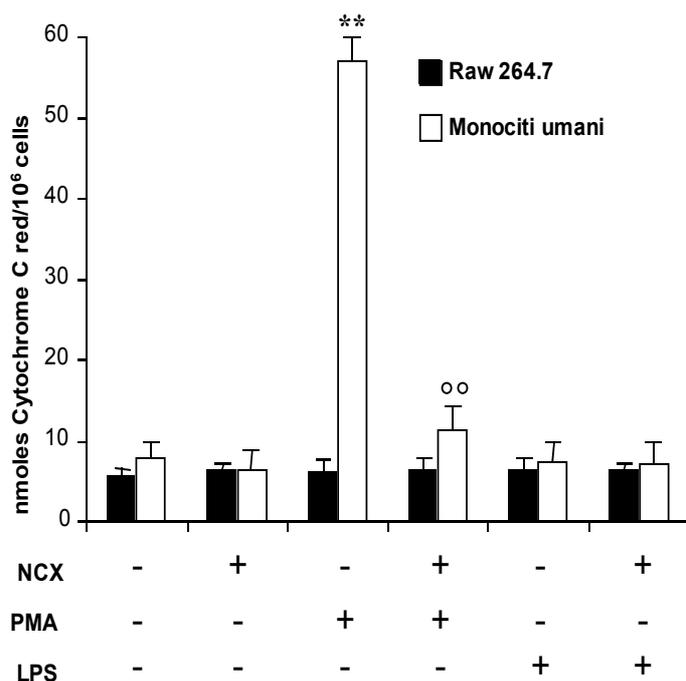


Fig.2 Effetti di NCX-6550 sulla produzione di anione superossido. I valori sono espressi come media \pm s.e.m. ** $p < 0.001$ vs CTR, °° $p < 0.01$ vs PMA.

| | % di inibizione della produzione di O_2^- indotta da PMA |
|---------------------|------------------------------------------------------------|
| NCX-6550 50 μM | 82 \pm 4 |
| NCX-6550 10 μM | 68 \pm 4 |
| NCX-6550 1 μM | 32 \pm 2 |
| PRAVA 50 μM | 55 \pm 6 |
| PRAVA 10 μM | 30 \pm 5 |
| PRAVA 1 μM | 5 \pm 3 |
| SNP 50 μM | 32 \pm 6 |
| SNP 10 μM | 21 \pm 5 |
| SNP 1 μM | 6 \pm 4 |

Tab. 1 Effetti inibitori dei vari composti sulla produzione di anione superossido indotto da PMA nei monociti. I valori sono espressi come media \pm s.e.m.

NCX-6550 inibisce il rilascio di citochine pro-infiammatorie in monociti e MDM

In accordo con studi precedenti (Amoruso et al., 2008), i monociti e gli MDM sono stati stimolati per 24 ore con PMA (10^{-7} M) per permettere il massimo rilascio di citochine da parte delle cellule. E' stato osservato che il rilascio di TNF- α indotto da PMA è maggiore nei monociti (1323 ± 58 pg/ml) rispetto agli MDM (574 ± 113 pg/ml) ($p < 0,05$). Come mostrato in fig.3, NCX-6550 e il ligando di PPAR- γ , 15d-PGJ, inibiscono, in maniera concentrazione-dipendente (1 nM – 50 μM), il rilascio di TNF- α indotto da PMA sia nei monociti (Fig. 3A) che negli MDM (Fig.3B). La 15d-PGJ risulta essere più potente di NCX-6550 nell'inibire il rilascio di TNF- α , sia nei monociti (IC_{50} : 92 nM

e 240 nM, rispettivamente) che negli MDM (IC_{50} : 48 nM e 52 nM, rispettivamente). NCX-6550, utilizzato a 50 μ M, è più efficace della pravastatina e delle altre due molecole NO-donatrici, ISMN e SNP, usate alla stessa concentrazione ($p < 0.001$) (Fig. 3).

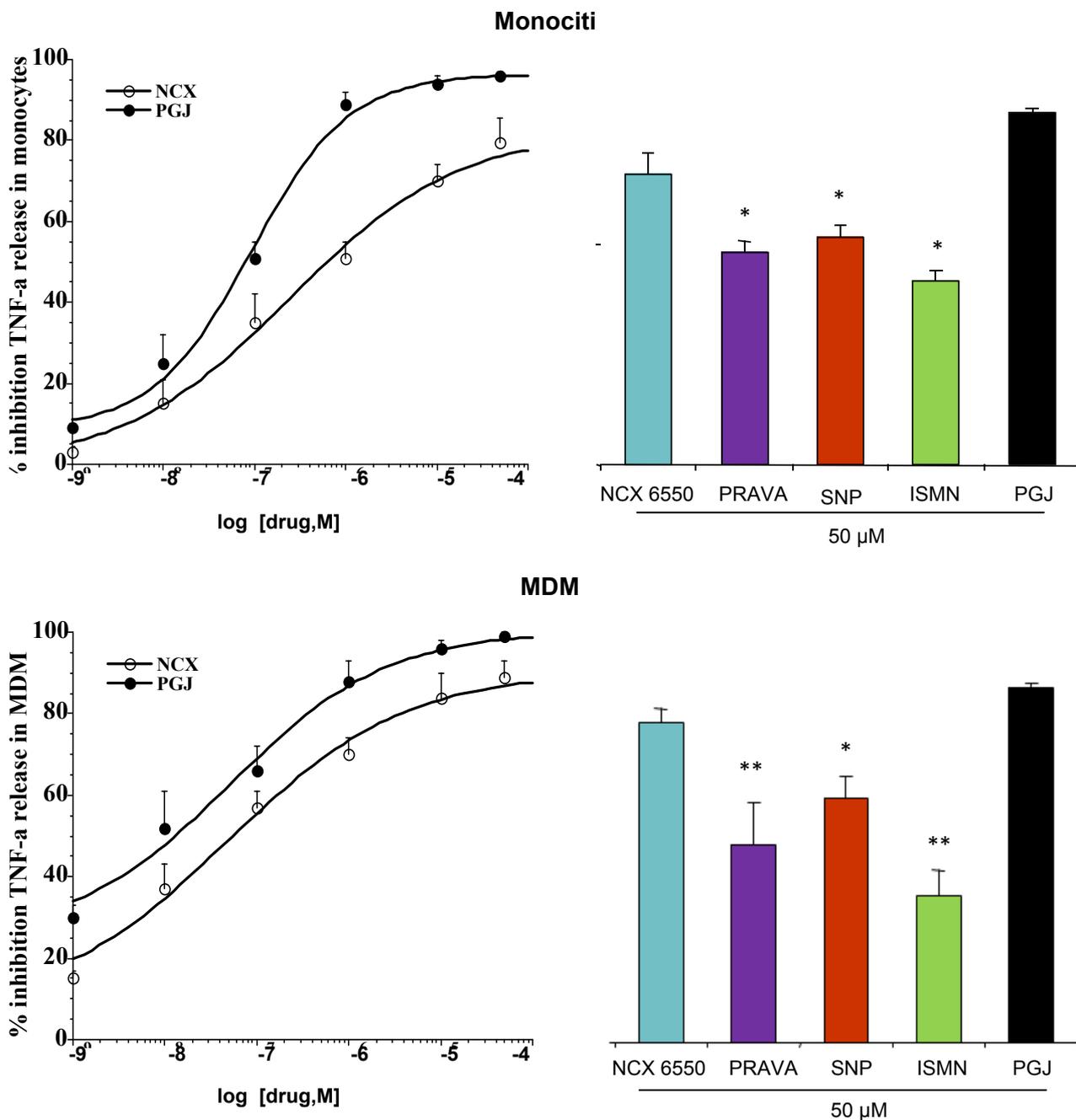


Fig.3 Effetti di NCX-6550 e 15d-PGJ sul rilascio di TNF- α in monociti e MDM. I valori sono espressi come media \pm s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs NCX 6550.

Risultati simili sono stati ottenuti per IL-6. La liberazione di questa citochina da parte del PMA è maggiore nei monociti (468 ± 70 pg/ml) rispetto agli MDM (309 ± 28 pg/ml) ($p < 0,05$). Come mostrato in Fig.4, NCX-6550 inibisce, in maniera concentrazione-dipendente (1 nM – 50 μ M), il

rilascio di IL-6 indotto da PMA sia nei monociti (Fig. 4A) che negli MDM (Fig.4B). Anche in questo caso, la 15d-PGJ è risultata essere maggiormente efficace rispetto a NCX-6550, sia nei monociti (IC_{50} : 72 nM e 122 nM, rispettivamente) che negli MDM (IC_{50} : 89 nM e 185 nM, rispettivamente). Infine, alla massima concentrazione di 50 μ M, NCX-6550 è significativamente più efficace rispetto alla pravastatina, a ISMN e SNP ($p < 0.001$).

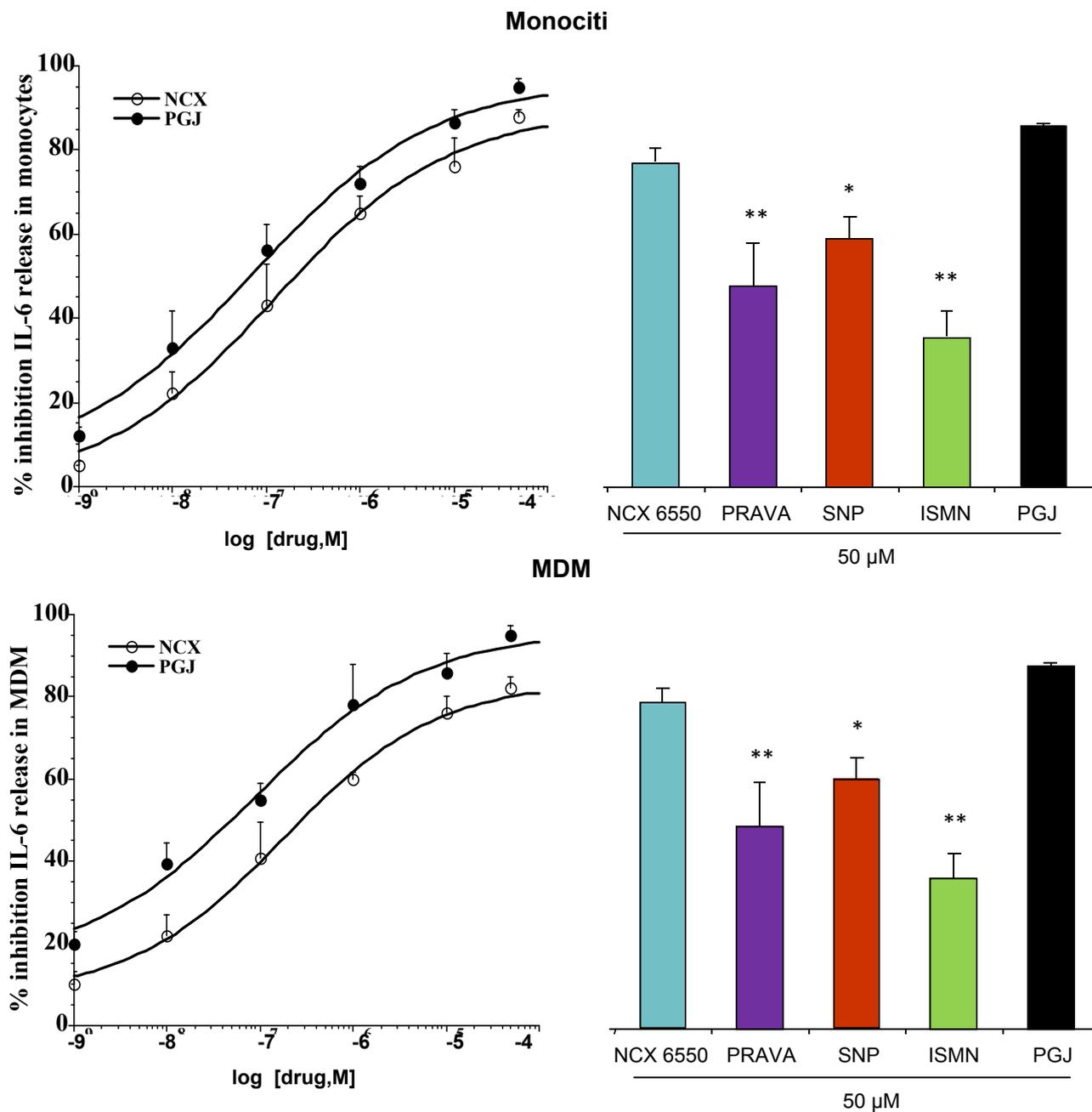


Fig.4 Effetti di NCX-6550 sul rilascio di IL-6 in monociti e MDM. I valori sono espressi come media \pm s.e.m. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs NCX-6550.

NCX-6550, così come le altre molecole in studio, non ha effetti significativi sul rilascio di IL-10 (non riportato). In questi esperimenti, PMA 10^{-7} M libera piccole quantità di citochina (50 ± 7 pg/ml nei monociti, 45 ± 8 pg/ml negli MDM).

NCX-6550 aumenta l'espressione di PPAR- γ in monociti e MDM

E' stato precedentemente osservato che PPAR- γ è espresso sia nei monociti che negli MDM umani (Amoruso et al., 2008, 2009) e che l'NO ne aumenta l'attività (Ptasinska et al., 2007). E' stato perciò verificato se NCX-6550 influenzasse l'espressione di PPAR- γ (Fig. 5). NCX-6550 ed SNP, nel range di concentrazione 1-50 μ M, aumentano in modo significativo l'espressione proteica del recettore nei monociti, mentre la pravastatina e ISMN non hanno effetto (Fig 5A). Negli MDM, i risultati ottenuti non raggiungono la significatività statistica, probabilmente a causa della maggiore espressione basale di PPAR- γ in queste cellule rispetto ai monociti (Amoruso et al., 2008, 2009) (Fig. 5B). La 15d-PGJ (10 μ M) è stata utilizzata come controllo interno positivo.

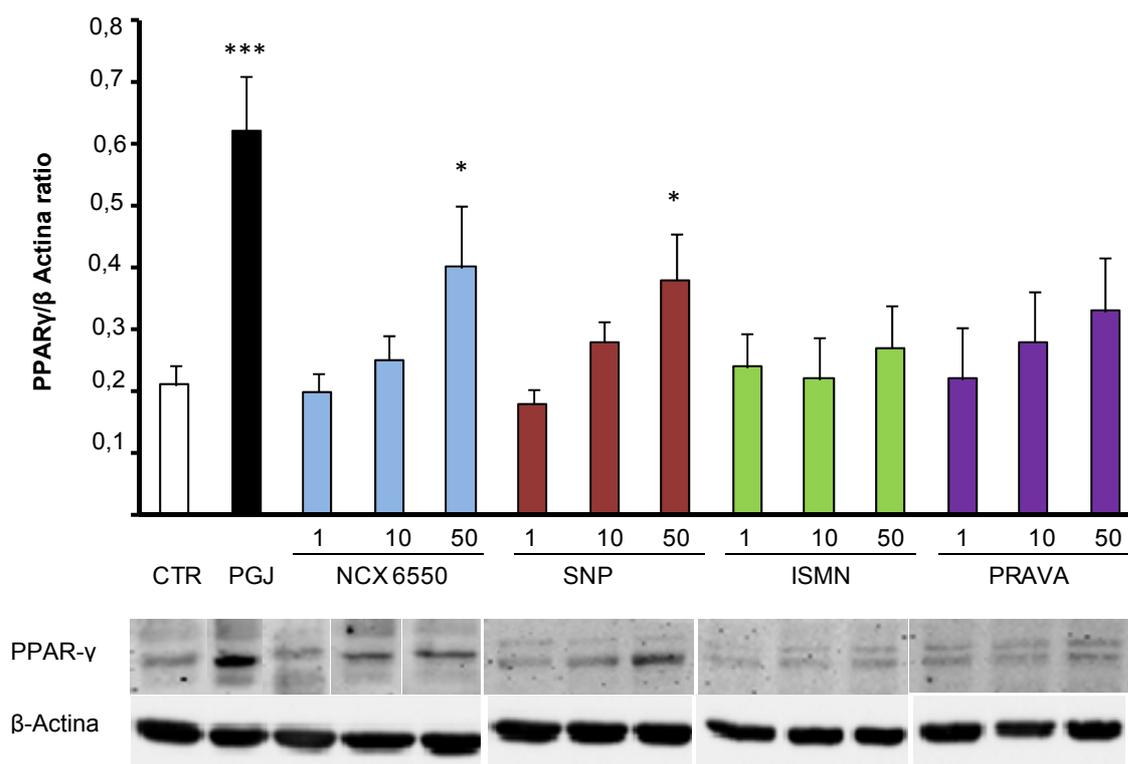


Fig. 5A Espressione proteica di PPAR- γ nei monociti. I valori sono espressi come media \pm s.e.m. *p < 0.05, ***p<0.001 vs CTR.

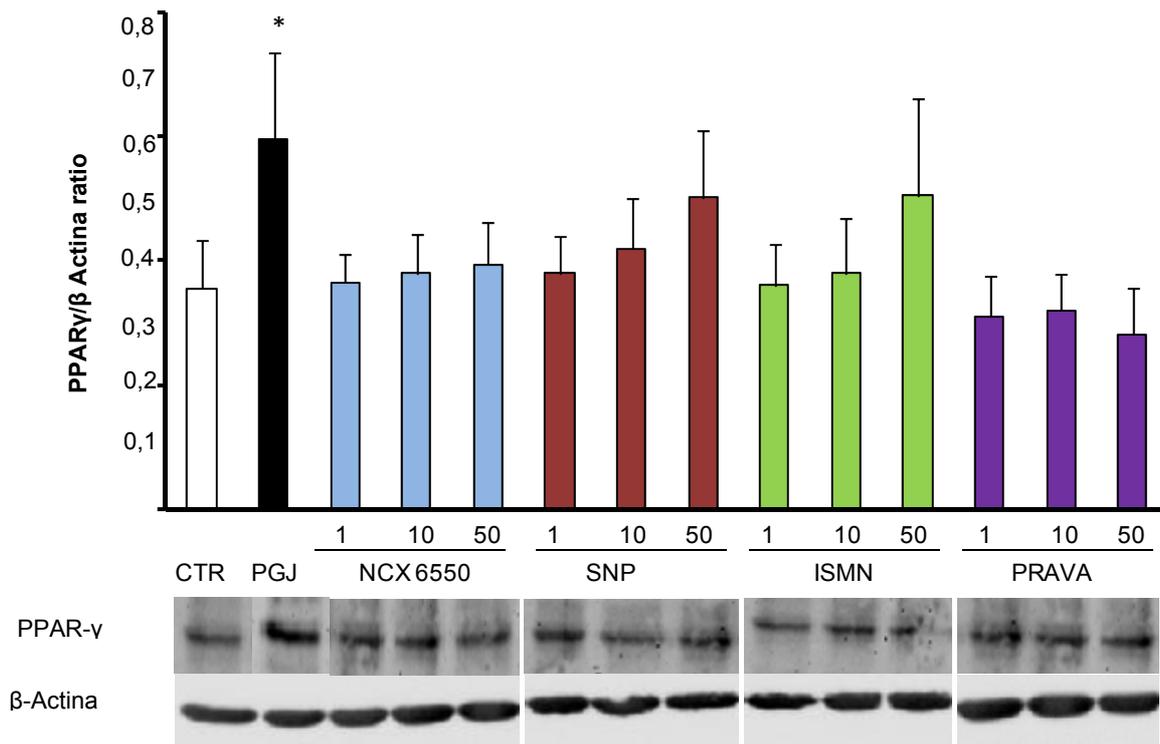


Fig. 5B Espressione proteica di PPAR- γ negli MDM. I valori sono espressi come media \pm s.e.m.* $p < 0.05$ vs CTR.

Tramite Real-Time PCR, sono stati valutati gli effetti di NCX-6550 sull'espressione genica di PPAR- γ nei monociti, in confronto a pravastatina, ISMN, SNP e due differenti ligandi di PPAR- γ , 15d-PGJ e Rosiglitazone. Tutti i composti aumentano i livelli di PPAR- γ mRNA di circa 2 volte rispetto al controllo ($p < 0.05$), senza significative differenze tra le varie molecole (Tab. 2).

| | Fold increase rispetto al controllo (controllo=1) | P value |
|---------------------|---------------------------------------------------|---------|
| Controllo | 1 | |
| 15d-PGJ 10 μ M | 1.61 \pm 0,05 | 0.05 |
| ROSI 1 μ M | 1.91 \pm 0,04 | 0.05 |
| NCX 6550 50 μ M | 2.01 \pm 0,12 | 0.05 |
| PRAVA 50 μ M | 1.68 \pm 0,03 | 0.05 |
| ISMN 50 μ M | 1.91 \pm 0,06 | 0.05 |
| SNP 50 μ M | 1.97 \pm 0,02 | 0.05 |

Tab. 2 Espressione genica di PPAR- γ nei monociti.

NCX-6550 inibisce la traslocazione di NF-κB indotta da PMA nei monociti e MDM

In questi esperimenti, le cellule sono state pre-trattate con le molecole NO-donatrici per 30' e poi stimulate con PMA (10^{-6} M) per 1 ora, per garantire il massimo effetto (Lavagno et al., 2004). Nei monociti, PMA induce una potente traslocazione e attivazione di NF-κB, attraverso il coinvolgimento della subunità p65, così come dimostrato dal supershift. NCX-6550 e SNP, utilizzati a 50 μM, inibiscono l'attivazione di NF-κB indotta da PMA, mentre la pravastatina è meno efficace (Fig. 6A). Inoltre, NCX-6550 inibisce, in maniera concentrazione-dipendente (10 nM-50 μM), l'attivazione di NF-κB indotta da PMA (Fig. 6B). L'agonista di PPAR-γ, 15d-PGJ, è stato utilizzato come controllo interno positivo, in quanto è nota la sua azione inibitoria su NF-κB (Straus et al., 2000). Negli MDM, allo stesso modo, NCX-6550 e le altre molecole NO-donatrici, ma non la pravastatina, inibiscono l'attivazione di NF-κB indotta da PMA (Fig. 6C).

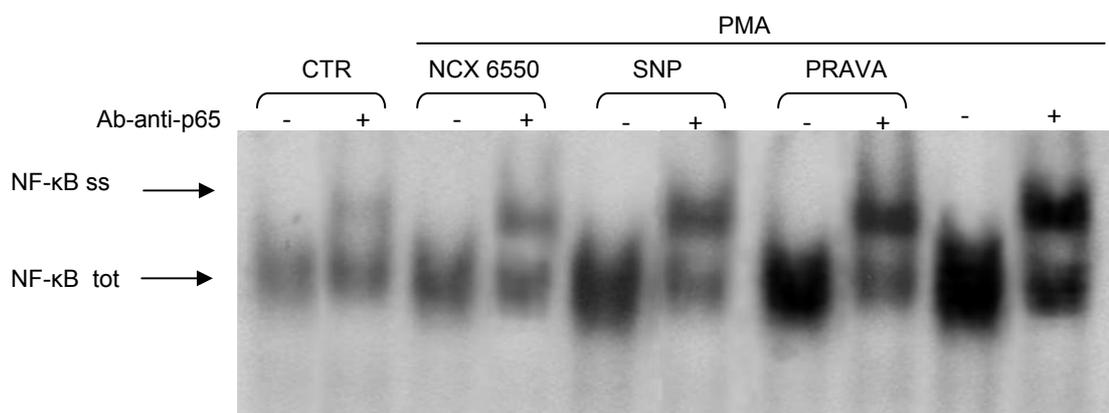


Fig. 6A Effetti delle molecole sulla traslocazione di NF-κB indotta da PMA nei monociti.

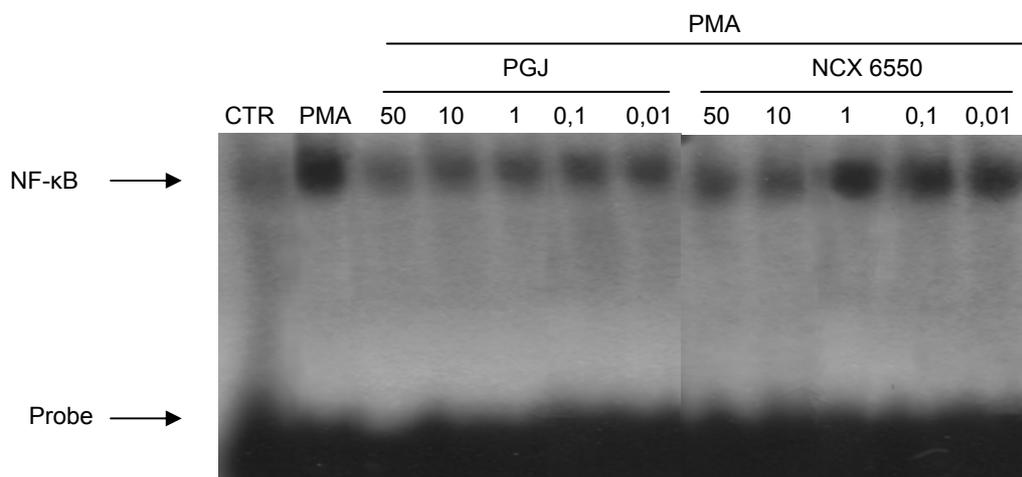


Fig. 6B NCX-6550 e 15d-PGJ inibiscono la traslocazione di NF-κB indotta da PMA in maniera concentrazione-dipendente.

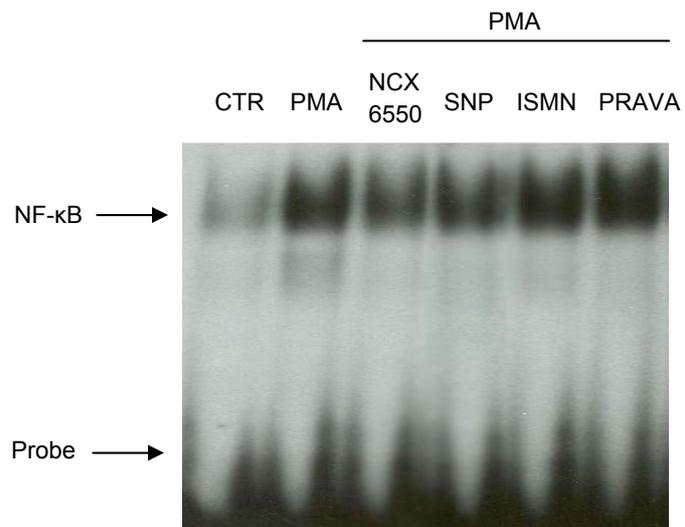


Fig. 6C Effetti delle molecole sulla traslocazione di NF-κB indotta da PMA negli MDM.

VALUTAZIONE DI NCX-429

Effetto di NCX-429 sulla produzione di nitriti e di anione superossido

Le cellule, sia monociti che MDM, sono state pre-trattate con NCX-429, Naprossene, NCX-1351 (isomero R di NCX-429 che ne mantiene la parte NO-donatrice senza attività su COX), R-NAP (isomero R del Naprossene, inattivo su COX), ISMN e SNP ad una concentrazione di 100 μM per 1 ora, e poi stimolate con PMA (10^{-7}M) per 24 ore. Come già discusso in precedenza, i monociti/macrofagi umani rilasciano bassi livelli di nitriti (Albina, 1995). Tutte le molecole in studio, ad eccezione di SNP, non influiscono in modo significativo sull'accumulo di nitriti nelle cellule, sia monociti (Tab. 3) che MDM (Tab. 4), in presenza o assenza di PMA.

Tab. 3 Rilascio di nitriti nei monociti.

| N=6 | Nitriti [mM] | + PMA 10^{-7} M | Nitriti [mM] |
|------------------------|------------------|------------------------|------------------|
| Controllo | 5.46 \pm 0.3 | PMA | 5.28 \pm 0.2 |
| + NCX 429 10^{-4} M | 5.14 \pm 0.2 | + NCX 429 10^{-4} M | 5.47 \pm 0.2 |
| + NCX 1351 10^{-4} M | 5.26 \pm 0.2 | + NCX 1351 10^{-4} M | 5.19 \pm 0.1 |
| + NAP 10^{-4} M | 5.13 \pm 0.2 | + NAP 10^{-4} M | 5.59 \pm 0.3 |
| + R-NAP 10^{-4} M | 5.22 \pm 0.1 | + R-NAP 10^{-4} M | 5.19 \pm 0.1 |
| + ISMN 10^{-4} M | 5.32 \pm 0.2 | + ISMN 10^{-4} M | 5.28 \pm 0.3 |
| + SNP 10^{-4} M | 15.34 \pm 1.1* | + SNP 10^{-4} M | 25.69 \pm 2.7* |

I valori sono espressi come media \pm s.e.m

Tab. 4 Rilascio di nitriti negli MDM.

| N=6 | Nitriti [mM] | + PMA 10^{-7} M | Nitriti [mM] |
|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|
| Controllo | 5.53 \pm 0.49 | PMA | 5.49 \pm 0.43 |
| + NCX 429 10^{-4} M | 5.23 \pm 0.47 | + NCX 429 10^{-4} M | 5.68 \pm 0.46 |
| + NCX 1351 10^{-4} M | 5.77 \pm 0.33 | + NCX 1351 10^{-4} M | 5.71 \pm 0.33 |
| + NAP 10^{-4} M | 5.38 \pm 0.48 | + NAP 10^{-4} M | 5.7 \pm 0.41 |
| + R-NAP 10^{-4} M | 5.77 \pm 0.36 | + R-NAP 10^{-4} M | 5.75 \pm 0.3 |
| + ISMN 10^{-4} M | 5.77 \pm 0.51 | + ISMN 10^{-4} M | 5.77 \pm 0.5 |
| + SNP 10^{-4} M | 21.18 \pm 3.67* | + SNP 10^{-4} M | 27.43 \pm 4.56* |

I valori sono espressi come media \pm s.e.m

E' stato inoltre verificato se NCX-429 influenzasse la produzione di O_2^- . Nei monociti, NCX-429, alla concentrazione di 1 μ M, inibisce la produzione di O_2^- indotta da PMA del 24%, con una maggior efficacia rispetto agli altri composti (NAP, SNP e ISMN) usati alla stessa concentrazione ($p < 0.05$ vs NCX-429). La produzione di O_2^- indotta da PMA è pari a 52.1 ± 7 nmol citocromo C ridotto/ 10^6 cell/30'. Negli MDM, NCX-429 (1 μ M) inibisce la produzione di O_2^- indotta da PMA del 60% rispetto al PMA stesso, mentre le altre molecole non hanno alcun effetto ($p < 0.05$ vs NCX-429) (Fig. 7). In queste cellule, la produzione di O_2^- indotta da PMA è pari a 29 ± 3 nmol citocromo C ridotto/ 10^6 cell/30'.

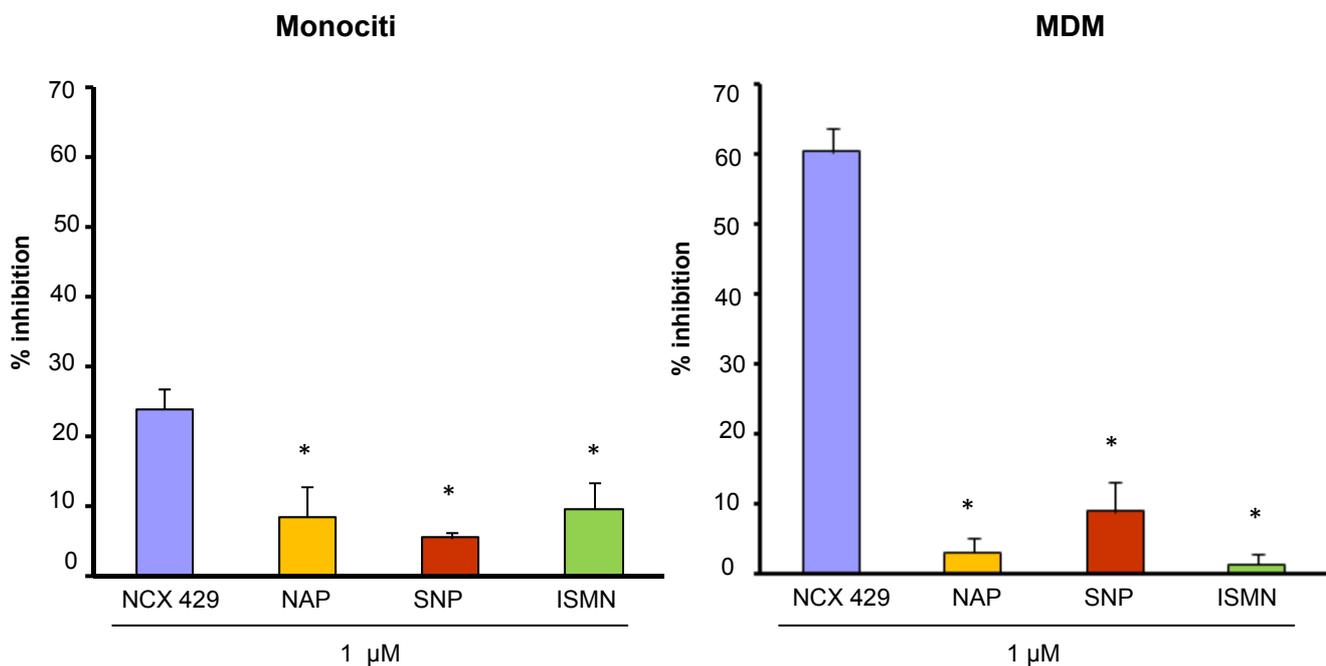


Fig.7 Effetti di NCX-429 sulla produzione di anione superossido nei monociti e negli MDM. I valori sono espressi come media \pm s.e.m. * $p < 0.05$ vs NCX 429.

NCX-429 inibisce il rilascio di citochine pro-infiammatorie in monociti e MDM

Per la valutazione del rilascio di citochine, le cellule sono state pre-trattate con i composti, in un range di concentrazione da 10^{-9} M a 10^{-4} M, per 1 ora e successivamente stimulate con PMA (10^{-7} M) per 24 ore. Nei monociti, PMA induce un rilascio di IL-6 pari a 131 ± 12 pg/ml. Come mostrato in Fig 8, NCX-429 inibisce, in maniera concentrazione-dipendente, il rilascio di IL-6 indotta da PMA, con una maggior efficacia rispetto a NAP e ISMN ($p < 0,05$). Da notare come, alla massima concentrazione (10^{-4} M), l'NCX-429 inibisce del $62 \pm 8\%$ il rilascio di IL-6, mentre il Naprossene inibisce del $36 \pm 4\%$ ($p < 0.05$ vs Naprossene). In questi esperimenti, i due isomeri R, NCX-1351 e R-Nap, non hanno inibito, in modo significativo, il rilascio di citochina.

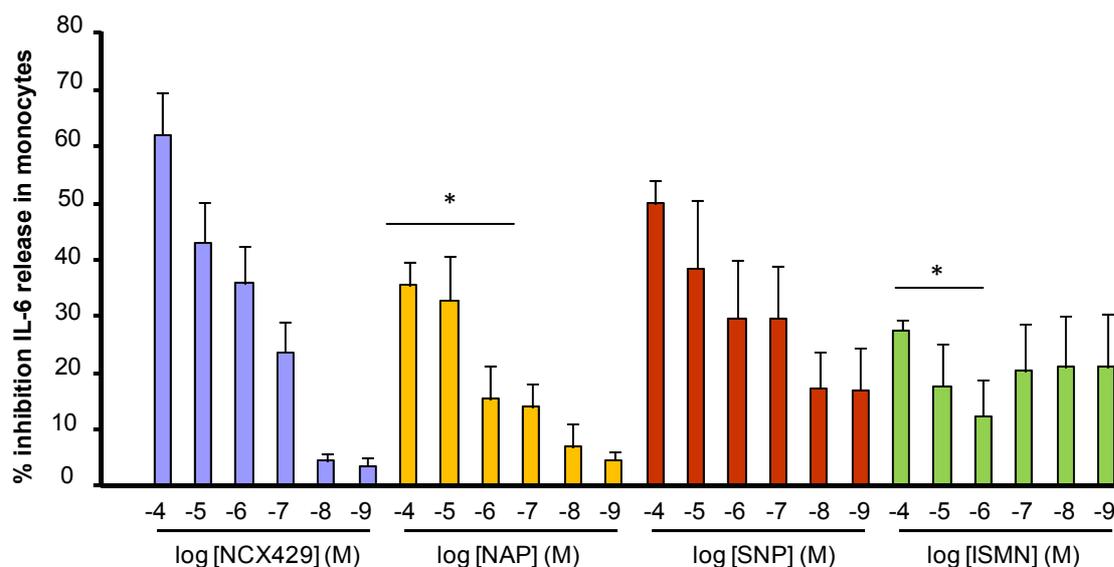


Fig.8 Effetti dei composti sul rilascio di IL-6 in monociti. I valori sono espressi come media \pm s.e.m.
*p < 0.05 vs NCX-429 equimolare.

Negli MDM, la quantità di IL-6 liberata dopo stimolazione con PMA è pari a 406 ± 75 pg/ml. NCX-429 inibisce, in modo concentrazione-dipendente, il rilascio di citochina, mentre NAP, SNP e ISMN hanno minor effetto. Alla massima concentrazione (10^{-4} M), NCX-429 inibisce del $52 \pm 11\%$ il rilascio di IL-6, mentre il Naprossene non ha effetto (Fig 9). NXC-429 è più efficace degli altri composti valutati anche alla concentrazione di 10^{-6} M. Anche in questo caso, i due isomeri R, NCX-1351 e R-Nap, non hanno inibito, in modo significativo, il rilascio di citochina.

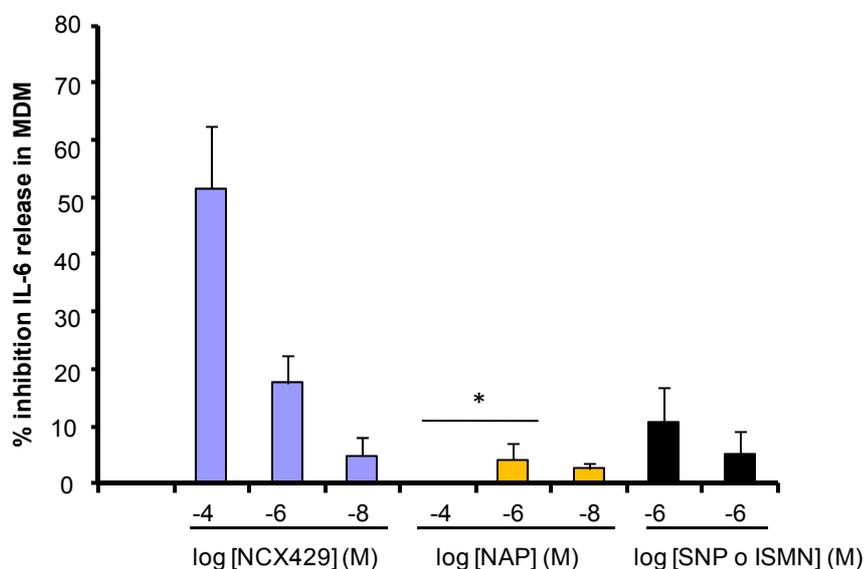


Fig.9 Effetti dei composti sul rilascio di IL-6 negli MDM. I valori sono espressi come media \pm s.e.m.
*p < 0.05 vs NCX 429 equimolare.

Si è valutato, inoltre, il rilascio di TNF- α in monociti e MDM. A differenza di quanto riscontrato per IL-6, i livelli di TNF- α indotti da PMA nei monociti sono pari a 1115 ± 74 pg/ml,

significativamente più alti di quelli dell'IL-6. Tutti i composti analizzati, NCX-429, Naprossene, SNP e ISMN, inibiscono, in maniera concentrazione-dipendente, il rilascio di TNF- α , senza differenze importanti tra le molecole (Fig 10). Anche in questo caso, i due isomeri R, NCX-1351 e R-Nap, non hanno alcun effetto.

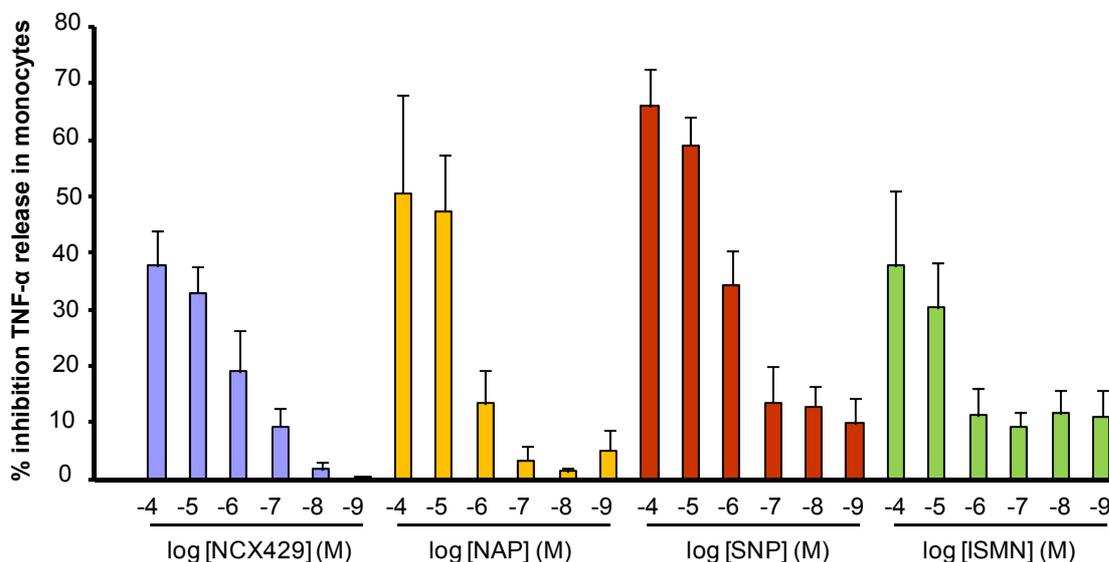


Fig.10 Effetti dei composti sul rilascio di TNF- α in monociti. I valori sono espressi come media \pm s.e.m

A differenza di quanto accade nei monociti, NCX-429 risulta significativamente più efficace del Naprossene nell'inibire il rilascio di TNF- α negli MDM ($p < 0.05$) (Fig 11). In queste cellule, PMA libera 448 ± 95 pg/ml di TNF- α . Gli isomeri R, NCX-1351 e R-Nap, non hanno inibito, in modo significativo, il rilascio di citochina.

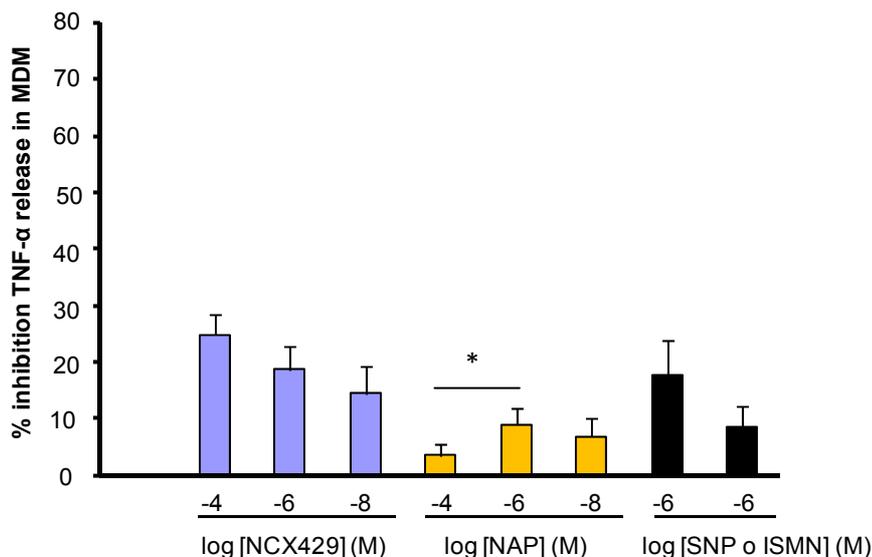


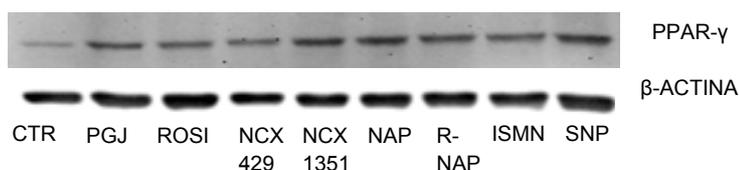
Fig.11 Effetti dei composti sul rilascio di TNF- α negli MDM. I valori sono espressi come media \pm s.e.m. * $p < 0.05$ vs NCX-429.

Effetto di NCX-429 sull'espressione di PPAR- γ in monociti e MDM

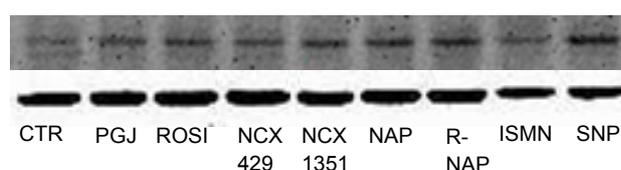
Sono stati, inoltre, valutati gli effetti dei composti sull'espressione proteica di PPAR- γ , in quanto, come ricordato in precedenza, questo recettore è presente nei monociti/MDM (Amoruso et al., 2008, 2009) e la sua espressione è influenzata dall'NO (Ptasinska et al., 2007). Le cellule, sia monociti che MDM, sono state trattate per 6 ore con NXC-429, Naprossene, NCX-1351, R-Nap, ISMN, SNP alla concentrazione massima di 100 μ M e con i ligandi agonisti di PPAR- γ , 15d-PGJ e Rosiglitazone, alla concentrazione di 10 μ M e 1 μ M, rispettivamente. Come schematizzato nelle seguenti tabelle, tutti i composti analizzati aumentano l'espressione proteica del recettore, avendo effetti simili a quelli dei ligandi agonisti, sia nei monociti (Tab 5) che negli MDM (Tab 6).

| Monociti N=6 | Fold Increase (media \pm S.E.M.) |
|----------------------|---------------------------------------|
| CTR | 1 |
| 15d-PGJ 10 μ M | 1,43 \pm 0,16 |
| ROSI 1 μ M | 1,64 \pm 0,12 |
| NCX 429 100 μ M | 1,80 \pm 0,2 |
| NCX 1351 100 μ M | 1,73 \pm 0,32 |
| NAP 100 μ M | 1,94 \pm 0,35 |
| R-NAP 100 μ M | 2,05 \pm 0,19 |
| ISMN 100 μ M | 1,89 \pm 0,16 |
| SNP 100 μ M | 2,38 \pm 0,36 |

| MDM N=4 | Fold Increase (media \pm S.E.M.) |
|----------------------|---------------------------------------|
| CTR | 1 |
| 15d-PGJ 10 μ M | 1,75 \pm 0,5 |
| ROSI 1 μ M | 1,8 \pm 0,63 |
| NCX 429 100 μ M | 2,32 \pm 0,94 |
| NCX 1351 100 μ M | 2,12 \pm 0,68 |
| NAP 100 μ M | 1,93 \pm 0,62 |
| R-NAP 100 μ M | 2,20 \pm 0,75 |
| ISMN 100 μ M | 2,33 \pm 0,89 |
| SNP 100 μ M | 2,53 \pm 0,74 |



Tab. 5 Espressione proteica di PPAR- γ nei monociti



Tab. 6 Espressione proteica di PPAR- γ negli MDM.

Gli esperimenti con NCX-6550 hanno evidenziato come questa statina, coniugata con una molecola NO-donatrice, inibisce il rilascio di citochine e l'attivazione di NF- κ B indotti da PMA nei monociti/MDM umani; inoltre, alla massima concentrazione valutata (50 μ M) aumenta l'espressione del recettore PPAR- γ nei monociti. Al contrario, il farmaco d'origine, la pravastatina, e i due composti NO-donatori, ISMN e SNP, non mostrano la stessa efficacia. E' importante sottolineare che NCX-6550, oltre agli effetti descritti, mantiene la proprietà, specifica delle statine in genere, di inibire l'enzima idrossi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) reduttasi, impedendo quindi la biosintesi di colesterolo (Ongini et al., 2004; Momi et al., 2007). In generale, quindi, NCX-6550 mostra effetti anti-infiammatori sia in modelli cellulari murini che in monociti umani, quest'ultimi importanti in patologie cardiovascolari, come l'aterosclerosi. Infatti, nei primi stadi della formazione della placca aterosclerotica, è presente un largo numero di *foam cells*, derivanti da monociti circolanti, che, una volta attivati, aderiscono e attraversano l'endotelio, si differenziano in macrofagi e accumulano lipidi, partecipando così alla progressione della malattia. Oltre a ciò, i monociti rappresentano un buon modello per lo studio degli effetti anti-infiammatori di composti a rilascio di NO. Diversi studi, hanno infatti dimostrato che, a differenza delle linee cellulari murine, i monociti/macrofagi umani, *in vitro*, rilasciano bassi livelli di NO anche in seguito a stimolazione, nonostante esprimano iNOS (Albina, 1995; Weinberg et al., 1995). Nei nostri esperimenti, dopo stimolazione con NCX-6550, è stato evidenziato un basso ma significativo accumulo di nitriti, che conferma le proprietà di rilascio di NO da parte della molecola. Inoltre, NCX-6550 inibisce, in maniera concentrazione-dipendente, la produzione di anione superossido nei monociti stimolati con PMA, dimostrandosi più efficace della pravastatina e di SNP. Come riportato in precedenza, alla massima concentrazione (50 μ M), NCX-6550 inibisce la produzione di O₂⁻ dell' 80% e alla concentrazione di 1 μ M ancora inibisce del 30%, a differenza degli altri composti che hanno minor effetto.

Negli ultimi anni, è stato dimostrato che le statine, oltre a ridurre i livelli di colesterolo, esercitano azioni anti-infiammatoria, anti-proliferativa e anti-trombotica, che dipendono, almeno in parte, dalla capacità delle statine di promuovere il rilascio di NO a livello endoteliale (Laufs et al., 1998; Wu, 2002). In particolare, le statine inibiscono l'attivazione di NF- κ B in monociti umani e aumentano l'espressione di PPAR- γ in cellule murine macrofagiche (Habib et al., 2008; Yano et al., 2007). A sua volta, NO possiede una duplice azione sull'espressione di iNOS, che dipende largamente dalla quantità di NO rilasciata nei tessuti: basse concentrazioni di NO inibiscono l'espressione di iNOS attraverso un meccanismo di *feedback* negativo. Per questo motivo, l'incorporazione di una molecola NO-donatrice a lento rilascio, nella struttura di una statina (NCX-6550), potrebbe conferire ulteriori proprietà anti-infiammatorie rispetto al farmaco originale, oltre ad una maggiore

liposolubilità (Ongini et al., 2004). I risultati da noi ottenuti confermano questa ipotesi, in quanto NCX-6550 è più efficace della pravastatina nell'inibire, in modo concentrazione-dipendente il rilascio TNF- α e IL-6 indotto da PMA, con maggior efficacia negli MDM rispetto ai monociti.

Tra i diversi fattori di trascrizione responsabili del rilascio di citochine pro-infiammatorie, ci siamo focalizzati su PPAR- γ e NF- κ B, in quanto attivamente presenti nei monociti/macrofagi umani (Amoruso et al., 2007, 2009; Bardelli et al., 2005). Differenti osservazioni sperimentali dimostrano che NO è in grado di bloccare l'attivazione di NF- κ B attraverso l'induzione e stabilizzazione del suo inibitore I κ B α e di attivare il recettore PPAR- γ (Peng et al., 1995; Ptasinska et al., 2007). Inoltre, i ligandi agonisti di PPAR- γ inibiscono il rilascio di citochine pro-infiammatorie (Jiang et al., 1998) e la via di segnale di NF- κ B (Straus et al., 2000). I risultati ottenuti nel nostro laboratorio sono in accordo con quanto riportato: sia nei monociti che negli MDM, infatti, NCX-6550 inibisce, in maniera concentrazione-dipendente, la traslocazione di NF- κ B indotta da PMA, avendo effetti minori rispetto a quelli dell'agonista di PPAR- γ , 15d-PGJ. Un altro importante risultato dei nostri studi, è che NCX-6550 aumenta l'espressione proteica di PPAR- γ (di circa 2 volte) e i livelli di messaggero, dimostrando effetti simili a quelli della 15d-PGJ. Gli altri composti, pravastatina, SNP e ISMN, aumentano i livelli di mRNA del recettore, senza avere effetti sull'espressione proteica.

La maggior capacità di NCX-6550 di indurre l'espressione di PPAR- γ , di inibire il rilascio di anione superossido, la produzione di citochine e l'attivazione di NF- κ B, rispetto alla pravastatina e agli altri composti NO-donatori, indica che la coniugazione con una molecola a rilascio di NO potrebbe realmente apportare ulteriori benefici, soprattutto per il trattamento di malattie cardiovascolari infiammatorie, come l'aterosclerosi.

I primi dati preliminari sugli effetti di NCX-429 in monociti e macrofagi umani hanno mostrato come questo nuovo composto abbia proprietà anti-infiammatorie maggiori rispetto al farmaco nativo, Naprossene, e ad altre molecole NO-donatrici (ISMN, SNP e NCX-1351). La coniugazione di una molecola a rilascio di NO al Naprossene (NCX-429) potrebbe, quindi, rappresentare una valida opzione terapeutica nel caso di malattie che richiedono trattamenti prolungati nel tempo, come ad esempio nell'artrite reumatoide e nell'osteoartrite (Geunsen, 2009). Invero, alcune osservazioni sperimentali documentano che, rispetto ai FANS tradizionali, NCX-429 mostra minore tossicità gastrointestinale, oltre ad un maggior effetto anti-infiammatorio (Cuzzolin et al., 1995; Davies et al., 1997). Nei nostri esperimenti, tutti i composti, ad eccezione di SNP, alla massima concentrazione (100 μ M), non provocano un accumulo di nitriti sia in monociti che MDM, anche dopo stimolazione con PMA. NCX-429, utilizzato alla concentrazione di 1 μ M, riduce in modo significativo la produzione di anione superossido indotto da PMA, con una maggior efficacia negli MDM rispetto ai monociti; le altre molecole hanno, invece, scarsi effetti. E' noto che l'inibizione del rilascio di citochine da monociti/macrofagi non rappresenta una proprietà tipica dei FANS

tradizionali, in quanto indipendente dall'inibizione di COX (Lavagno et al., 2004). Alcuni FANS, tuttavia, tra cui il Naprossene, agiscono da agonisti per il recettore PPAR- γ ed in ultimo bloccano la produzione di mediatori flogistici (Jaradat et al., 2001). I risultati da noi ottenuti evidenziano che NCX-429 (100 μ M) è significativamente più efficace del Naprossene, di ISMN e SNP, nell'inibire il rilascio di IL-6, indotto da PMA, con effetti simili nei monociti e negli MDM. Non ci sono differenze significative tra i diversi composti nell'inibizione della produzione di TNF- α nei monociti, mentre negli MDM, NCX-429 è risultato più efficace.

Come noto, NO attiva PPAR- γ (Ptasinska et al., 2007) e, di fatto, nei nostri esperimenti NCX-429 aumenta l'espressione proteica di questo recettore, così come gli agonisti, sia nei monociti che negli MDM. Effetti simili sono stati ottenuti anche per gli altri composti in studio. I nostri risultati evidenziano come NCX-429 abbia un effetto anti-infiammatorio aggiuntivo rispetto al Naprossene e ad altre molecole NO-donatrici: questo nuovo CINOD, nel modello *in vitro* monocitario/macrofagico umano, riduce la produzione di anione superossido, il rilascio di citochine ed aumenta l'espressione PPAR- γ . Ulteriori esperimenti saranno volti a verificare se NCX-429 agisca su NF- κ B, inibendo la sua attivazione, con effetti maggiori rispetto al Naprossene e alle altre molecole NO-donatrici.

In conclusione, gli esperimenti svolti nel mio primo anno di dottorato, sull'azione anti-infiammatoria di nuovi composti a rilascio di NO, NCX-6550 e NCX-429, sui monociti e macrofagi umani, mostrano come queste nuove molecole siano in effetti più efficaci rispetto ai farmaci nativi, pravastatina e Naprossene. La coniugazione dei farmaci a molecole NO-donatrici apporta, in ultimo, supplementari proprietà farmacologiche, tra cui un'aumentata sicurezza e tollerabilità dei nuovi composti, che potrebbero risultare utili in caso di terapie prolungate nel tempo.

BIBLIOGRAFIA

- Albina JE. On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? *J Leukoc Biol* 58: 643-649 (1995).
- Amoruso A, Bardelli C, Fresu LG, Palma A, Vidali M, Ferreo V, Ribichini F, Vassanelli C, Brunelleschi S. Enhanced PPAR- γ expression in monocyte/macrophages from Coronary Artery Disease patients and possible Gender Differences. *J Pharmacol Exp Ther* 331: 531-538 (2009).
- Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, Fresu LG, Ferrero V, Brunelleschi S. Quantification of PPAR- γ protein in monocyte/macrophages from healthy smokers and non-smokers: a possible direct effect of nicotine. *Life Sci* 81: 906-915 (2007).
- Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, Ribichini F, Brunelleschi S. A novel activity for substance P: stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in human monocytes and macrophages. *Br J Pharmacol* 154: 144–152 (2008).
- Bardelli C, Gunella G, Varsaldi F, Balbo P, Del Boca E, Seren Bernardone I, Amoruso A, Brunelleschi S. Expression of functional NK1 receptors in human alveolar macrophages: superoxide anion production, cytokine release and involvement of NF- κ B pathway. *Br J Pharmacol* 145: 385-396 (2005).
- Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res* 44: 437-50 (2001).
- Brunelleschi S, Bordin G, Colangelo D, Viano I. Tachykinin receptors on human monocytes: their involvement in rheumatoid arthritis. *Neuropeptides* 32: 215-223 (1998).
- Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci* 14:1-18 (2009).
- Burgaud JL, Ongini E, Del Soldato P. Nitric oxide-releasing drugs: a novel class of effective and safe therapeutic agents. *Ann NY Acad Sci* 962: 360-371 (2002).
- Colasanti M, Suzuki H. The dual personality of NO. *Trends Pharmacol Sci* 21: 249-252 (2000).
- Cuzzolin L, Conforti A, Adami A, Lussignoli S, Menestrina F, Del Soldato P, Benoni G. Anti-inflammatory potency and gastrointestinal toxicity of a new compound, nitronaproxen. *Pharmacol Res* 31: 61-65 (1995).
- Davies NM, Røseth AG, Appleyard CB, McKnight W, Del Soldato P, Calignano A, Cirino G, Wallace JL. NO-naproxen vs naproxen: ulcerogenic, analgesic and anti-inflammatory effects. *Aliment Pharmacol Ther* 11: 69-79 (1997).
- Dever G, Spickett CM, Kennedy S, Rush C, Tennant G, Monopoli A, Wainwright CL. The nitric oxide-donating pravastatin derivative, NCX 6550 reduces splenocyte adhesion and reactive

- oxygen species generation in normal and atherosclerotic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 419-426. (2007).
- Di Filippo C, Monopoli A, Ongini E, Perretti M, D'Amico M. The cardio-protective properties of Ncx-6550, a nitric oxide donating pravastatin, in the mouse. *Microcirculation* 17: 417-426 (2010).
 - Emanuelli C, Monopoli A, Kraenkel N, Meloni M, Gadau S, Campesi I, Ongini E, Madeddu P. Nitropravastatin stimulates reparative neovascularisation and improves recovery from limb Ischaemia in type-1 diabetic mice. *Br J Pharmacol* 150: 873-882 (2007).
 - Feelisch M. The chemical biology of nitric oxide - an outsider's reflections about its role in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16 Suppl 2: S3-S13 (2008).
 - Furchgott RF e Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376 (1980).
 - Geusens P. Naproxinod, a new cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donator (CINOD). *Expert Opin Biol Ther* 9: 649-657 (2009).
 - Habib A, Shamseddeen I, Nasrallah MS, Antoun TA, Nemer G, Bertoglio J, Badreddine R, Badr KF. Modulation of COX-2 expression by statins in human monocytic cells. *FASEB J* 21: 1665-1674 (2007).
 - Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 36: 7-22 (2002).
 - Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61: 866-879 (1987).
 - Jaradat MS, Wongsud B, Phornchirasilp S, Rangwala SM, Shams G, Sutton M, Romstedt KJ, Noonan DJ, Feller DR. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H(2) synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin. *Biochem Pharmacol* 62: 1587-1595 (2001).
 - Jiang C, Ting At, Seed B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 82-86 (1998).
 - Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97: 1129-1135 (1998).
 - Lavagno L, Gunella G, Bardelli C, Spina S, Fresu LG, Viano I, Brunelleschi S. Anti-inflammatory drugs and Tumour Necrosis Factor- α production from monocytes: role of transcription factor NF- κ B and implication for rheumatoid arthritis therapy. *Eur J Pharmacol* 501: 199-208 (2004).

- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408 (2001).
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52: 375-414 (2000).
- Marik PE, Varon J. Perioperative hypertension: a review of current and emerging therapeutic agents. *J Clin Anesth* 21: 220-229 (2009).
- Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch* 459: 807-816 (2010).
- Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol* 15: 305-321 (2007).
- Momi S, Impagnatiello F, Guzzetta M, Caracchini R, Guglielmini G, Olivieri R, Monopoli A, Gresele P. NCX 6560, a nitric oxide-releasing derivative of atorvastatin, inhibits cholesterol biosynthesis and shows anti-inflammatory and anti-thrombotic properties. *Eur J Pharmacol* 570: 115-124 (2007).
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012 (1993).
- Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?. *J Clin Invest* 100: 2417-2423 (1997).
- Ongini E, Impagnatiello F, Bonazzi A, Guzzetta M, Govoni M, Monopoli A, Del Soldato P, Ignarro LJ. Nitric oxide (NO)-releasing statin derivatives, a class of drugs showing enhanced antiproliferative and antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8497-8502 (2004).
- Parker JD, Parker JO. Nitrate therapy for stable angina pectoris. *N Engl J Med* 338: 520-531 (1998).
- Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* 270: 14214-14219 (1995).
- Ptasinska A, Wang S, Zhang J, Wesley RA, Danner RL. Nitric oxide activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma through a p38 MAPK signaling pathway. *FASEB J* 21: 950-961 (2007).
- Rossiello MR, Momi S, Caracchini R, Giannini S, Guglielmini G, Monopoli A, Ongini E, Semeraro N, Colucci M, Gresele P. A novel nitric oxide-releasing statin derivative exerts an antiplatelet/antithrombotic activity and inhibits tissue factor expression. *J Thromb Haemost* 3: 2554-2562 (2005).
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675-683 (2001).

- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J₂ inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4844-4849 (2000).
- Tepperman BL, Chang Q, Soper BD. Protein kinase C mediates lipopolysaccharide-and phorbol-induced nitric-oxide synthase activity and cellular injury in the rat colon. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 1249-1257 (2000).
- Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 443-452 (2007).
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)* 196: 193-222 (2009).
- Wallace JL, Del Soldato P. The therapeutic potential of NO-NSAIDs. *Fundam Clin Pharmacol* 17: 11-20 (2003).
- Wallace JL, Reuter BK, Cirino G. Nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs: a novel approach for reducing gastrointestinal toxicity. *J Gastroenterol Hepatol* 9 Suppl 1: S40-44 (1994).
- Wallace JL, Viappiani S, Bolla M. Cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donators for osteoarthritis. *Trends Pharmacol Sci* 30: 112-117 (2009).
- Weigert A, Brüne B. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide* 19: 95-102 (2008).
- Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE, Haney AF, Granger DL. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86: 1184-1195 (1995).
- Wu KK. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann NY Acad Sci* 962: 122-130 (2002).
- Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res* 100: 1442-1451 (2007).

PUBBLICAZIONI

Amoruso A, Bardelli C, Fresu LG, Poletti E, Palma A, **Canova DF**, Zeng HW, Ongini E, Brunelleschi S. The nitric oxide-donating pravastatin, NCX 6550, inhibits cytokine release and NF-kappaB activation while enhancing PPARgamma expression in human monocyte/macrophages. *Pharmacol Res* 62: 391-399 (2010).

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

- Convegno IRCAD “*Malattie autoimmuni, dal laboratorio al paziente*” **Novara** (26 Febbraio 2010)
- “*3th European Workshop on Lipid Mediators*” - Pasteur Institute – **Paris** (3-4 Giugno, 2010)

SEMINARI (Dipartimento di Scienze Mediche AA 2009-2010)

- *ALK e tumori genesi* Prof. G. Inghirami (17/11/09)
- *Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression* Prof. N. Mermoud (30/11/09)
- *Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare* Prof. F. Grassi (14/12/09)
- *LSD1, Lysine Specific Demethylase1: insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation* Dr. E. Battaglioli (20/01/10)
- *Dal difetto genetico all'infiammazione* Prof. L. Maiuri (28/01/10)
- *R & D of magnetic-nanoparticles and carriers for drugs* Dr. G. Baldi (9/02/10)
- *Prediction of RNA-RNA interaction* Prof. H.Tafer (26/05/10)
- *Combating Bioterrorism: New Antidotes for an Old Poison* Dr. S.R. Ellis (10/06/10)
- *Fenotipo e cellule staminali tumorali nei glomi* Prof. D. Schiffer (14/06/10)

- *MicroRna nell terapia tumorale* Prof.ssa C. Ponzetto (15/06/10)
- *Identificazione di antigeni per la diagnosi e la terapia del carcinoma pancreatico mediante l'analisi sierologica del proteoma* Prof. F. Novelli (30/06/10)
- *Role of membrane lipids in neuronal synapses organization* Prof.ssa P. Camoletto (5/07/10)
- *Ruolo delle microvescicole nella comunicazione tra cellule* Prof. G. Camusi (6/09/10)
- *Prevention and cure of autochthonous mammary carcinomas in her2 transgenic mice?* Prof.ssa F. Cavallo (17/09/10)
- *Le cellule staminali tumorali: dalla biologia alla clinica* Prof. R. De Maria (22/09/10)
- *Preventing Persisters: Targeting Epigenetic Changes in Cancer Chemotherapy* Dr. S.R. Ellis (23/09/10)

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA:

- Lezioni frontali di oncologia interni al dipartimento (Prof. Albano)
- Journal Club (Dip. Scienze Mediche)