

# EFFETTO DELL'ARPAGOSIDE SUL *BURST* RESPIRATORIO DEI NEUTROFILI DI SUINO

## *HARPAGOSIDE'S EFFECT ON THE RESPIRATORY BURST OF PORCINE NEUTROPHILS*

MOSCA F., MARRUCHELLA G., MARIANI F., TISCAR PG.

*Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Piano d'Accio snc, Teramo*

**Parole chiave:** Neutrofili, Fitoestratti, *Burst* respiratorio

**Key words:** Neutrophils, Phytoextracts, Respiratory burst

### **Riassunto**

L'artiglio del diavolo (*Harpagophytum procumbens*) è una pianta tuberosa particolarmente ricca di arpagoside, glicoside a ben nota attività anti-infiammatoria. Infatti, gli estratti della pianta hanno trovato rapida applicazione in campo medico nel trattamento di patologie infiammatorie croniche a carico del sistema muscolo-scheletrico. Nel presente studio, l'attività dell'arpagoside è stata valutata *in vitro* sul *burst* respiratorio di granulociti neutrofili di suino, evidenziando una significativa attività di inibizione della produzione di specie reattive dell'ossigeno. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire i meccanismi di azione, le vie metaboliche ed i livelli farmacocinetici dell'arpagoside, come pure per verificare gli effetti additivi o sinergici di altre molecole presenti nei fitoestratti di *H. procumbens*.

### **Abstract**

Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) is a tuberous plant particularly rich in harpagoside, a glycoside provided with well-known anti-inflammatory properties. Indeed, the plant's extracts are currently used in humans for long-term treatment of chronic, inflammatory musculo-skeletal disorders. In the present study, the *in vitro* effects of harpagoside on the respiratory *burst* of porcine neutrophils were investigated. Our results showed a significant inhibition of the production of reactive oxygen species. Further studies are required to understand the mechanisms of action, the metabolic pathways and the pharmacokinetic levels of harpagoside, as well as to verify the potential additive and synergic effects of the other *H. procumbens*' active constituents.

### **INTRODUZIONE**

L'artiglio del diavolo (*Harpagophytum procumbens*) è una pianta xerofila di tipo tuberoso. Impiegata per secoli come anti-infiammatorio naturale dalle popolazioni del *Kalahari* in Africa (van Wyk, 2008), la pianta venne introdotta in Europa ai primi del '900, suscitando particolare interesse per le proprietà farmacologiche degli estratti ottenuti dalle radici secondarie, efficaci nel trattamento di patologie infiammatorie croniche dell'apparato muscolo-scheletrico (Grant et al., 2007; Gagnier et al., 2004).

I glicosidi iridoidi costituiscono i più importanti principi attivi di *H. procumbens*. In particolare, l'efficacia degli estratti sembra strettamente correlata alla concentrazione di arpagoside – sia *in vivo* (Chrubasik et al., 1999) che *in vitro* (Anauate et al., 2010) – tanto che la Farmacopea europea ha definito un livello minimo di arpagoside ( $\geq 1.2\%$ ) nelle preparazioni commerciali ottenute dalle radici di *Harpagophytum* (European Pharmacopeia, 2005).

I granulociti neutrofili ("polimorfonucleati", PMN) sono cellule effettrici dell'immunità innata a prevalente attività fagocitaria. La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) durante il *burst* respiratorio è un evento chiave del processo fagocitario. I ROS hanno un notevole potere microbicida; tuttavia, possono danneggiare cellule e tessuti dell'ospite, soprattutto in corso di

processi infiammatori cronici e/o particolarmente intensi (Manda-Handzlik and Demkow, 2015). Questo studio si pone l'obiettivo di valutare l'azione dell'arpagoside sul *burst* respiratorio dei PMN di suino sottoposti a stimolazione fagocitaria.

## **MATERIALI E METODI**

### **Campionamento**

Sono stati oggetto di studio 11 suini "ibridi commerciali" di circa 160 Kg p.v. e 10 mesi di età. I suini sono stati regolarmente macellati ed il sangue raccolto in provette con anticoagulante (EDTA) al momento della iugulazione.

### **Purificazione dei PMN**

I campioni di sangue sono stati diluiti in PBS (1:1 v/v), stratificati su gradiente Histopaque 1077 e centrifugati. Il *pellet* è stato risospeso in tampone di lisi (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4, 0.4% EDTA) ed incubato per 15 min al fine di rimuovere gli eritrociti. I PMN sono stati nuovamente lavati in PBS per due volte ed infine risospesi in DMEM.

La purezza del preparato cellulare è stata valutata microscopicamente previa colorazione con Hemacolor® (Merck), su un numero non inferiore a 500 PMN. Inoltre, la vitalità e la concentrazione cellulare del preparato sono state misurate con un apposito strumento (Vi-Cell, Beckman Coulter), standardizzando la concentrazione ad un valore di 3 x 10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup>.

### **Valutazione quantitativa del *burst* respiratorio**

Ciascun campione è stato suddiviso in aliquote, posto in piastre a 96 pozzetti ed incubato per 2 ore a 37 °C con differenti concentrazioni di arpagoside (400, 200, 100, 10, 1 µg/ml). Un'aliquota non è stata trattata con arpagoside al fine di fornire valori di riferimento del *burst* respiratorio. Successivamente, la piastra è stata centrifugata, i PMN lavati in PBS ed incubati con il luminolo (1 mM per 10 min).

Il *burst* respiratorio è stato indotto con cellule di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) e la luminescenza è stata monitorata mediante lettore multi-modale (Sinergy H1, Bio-Tek) per 2 ore, con letture di ogni singolo pozzetto ad intervalli di 1 min. I dati sono stati espressi dallo strumento come AUC ("*Area Under Curve*") e successivamente riportati in termini percentuali rispetto ai valori di riferimento.

Al fine di evidenziare eventuali effetti tossici, la vitalità e la concentrazione dei preparati sono state, inoltre, valutate 2 ore dopo l'incubazione con arpagoside alla concentrazione massima utilizzata nel presente studio (400 µg/ml).

Ove non diversamente specificato, tutti i reagenti in uso sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

### **Analisi statistica**

I dati sono stati analizzati mediante ANOVA ad una via e test *post-hoc* di Tukey's, con livello di accettabilità di p<0.001.

## **RISULTATI**

### **Purificazione dei PMN**

La metodica di purificazione ha permesso di ottenere sospensioni cellulari adeguatamente purificate (PMN >90%, Fig. 1) e vitali (vitalità >85%).

### **Misurazione *burst* respiratorio**

Il trattamento con arpagoside ha determinato un significativo decremento della luminescenza, a concentrazione di 400 µg/ml (p<0.0001), 200 µg/ml (p<0.0001) e 100 µg/ml (p<0.001). Nel confronto con i valori di riferimento, l'esposizione a tali concentrazioni ha determinato una percentuale di luminescenza del 56.8±10.6, 68.7±11.1 e 81.6±12.9, rispettivamente (Fig. 2). Al contrario, concentrazioni di arpagoside pari a 10 µg/ml e 1 µg/ml non hanno determinato significative variazioni della risposta.

L'esposizione dei PMN a 400 µg/ml di arpagoside non ha comportato variazioni significative della loro concentrazione e vitalità.

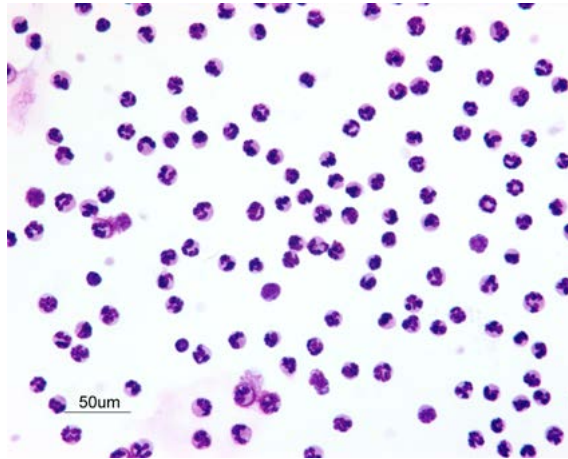


Figura 1. Striscio di purificato cellulare colorato con Hemacolor®. L'immagine conferma che la popolazione cellulare così ottenuta è costituita quasi esclusivamente da granulociti polimorfonucleati. Ob. x40 (bar = 50 micron).

*Figure 1.* Isolation of PMNs from blood samples. Microscopic observation after staining with Hemacolor® confirms that the cellular population mostly consist of PMNs (final magnification = x400).

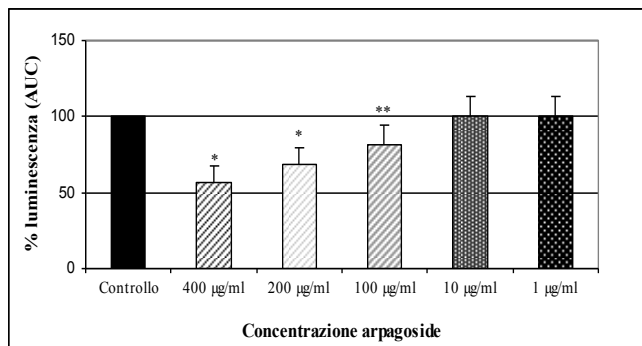


Figura 2. Effetti dell'arpagoside sul *burst* respiratorio di PMN. I valori sono stati riportati come luminescenza (AUC) in termini percentuali rispetto ai valori di controllo (100%). (\* $p < 0.0001$  vs controllo; \*\* $p < 0.001$  vs controllo)

*Figure 2.* Harpagoside's effects on the PMN respiratory burst. Data are expressed as percentage of the luminescence (AUC) compared to control values (100%). (\* $p < 0.0001$  vs control; \*\* $p < 0.001$  vs control).

## DISCUSSIONE

Negli ultimi decenni, l'impiego delle piante medicinali ha suscitato notevole interesse scientifico, soprattutto nei confronti di estratti in grado di modulare il sistema immunitario (Huang et al., 2008). A fronte di numerosi studi volti a verificare il potenziale impiego delle piante medicinali negli animali da reddito (Clausen et al., 2013), sono tuttora pochi i dati disponibili circa le proprietà anti-infiammatorie dei fitoestratti nella specie suina (Liu et al., 2012, 2013; Kori et al., 2009).

Nel presente studio, l'arpagoside ha determinato un significativo decremento del *burst* respiratorio nei PMN a concentrazioni superiori a 100 µg/ml. I meccanismi di inibizione del *burst* respiratorio non sono stati ancora chiariti. Tuttavia, ciò non sembra dipendere dall'azione antiossidante dell'arpagoside (Grant et al., 2009; Betancor-Fernández et al., 2003), ma piuttosto dall'inibizione dell'enzima NADPH ossidasi, responsabile dell'attivazione del *burst* respiratorio con produzione di anione superossido (El-Benna et al., 2009). Al riguardo, è utile ricordare che altri estratti vegetali si sono dimostrati capaci di inibire l'assemblaggio della NADPH ossidasi nei PMN (Boukemara et al., 2016; Varga et al., 2004). Inoltre, come già noto per altri fitoestratti (Nastasijević et al., 2012; Tsumbu et al., 2012), l'effetto dell'arpagoside potrebbe anche dipendere dall'inibizione della mieloperossidasi, sistema enzimatico parimenti coinvolto nel *burst* respiratorio. Ad oggi, è difficile ipotizzare dosaggi e livelli plasmatici di arpagoside da raggiungere per ottenere l'effetto desiderato. Analogamente, è utile rimarcare che anche gli effetti dei farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) sul *burst* respiratorio dei PMN sono piuttosto controversi. Molti FANS inibiscono la sintesi di ROS in PMN umani a concentrazioni estremamente variabili (Parij et al., 1998) e ben superiori ai livelli farmacocinetici descritti (Netter et al., 1989).

## CONCLUSIONI

In conclusione, riteniamo che i dati qui riferiti rappresentino un utile punto di partenza per lo studio delle proprietà anti-infiammatorie dell'arpagoside nella specie suina e, più in generale, in ambito comparato. Ulteriori indagini saranno necessarie per chiarire i meccanismi di azione, le vie metaboliche ed i livelli farmacocinetici dell'arpagoside, come pure per verificare gli effetti additivi o sinergici di altre molecole (glicosidi iridoidi e feniletanoidi etc.) presenti nei fitoestratti di *H. procumbens*.

## BIBLIOGRAFIA

Anauate M.C., Torres L.M., de Mello S.B. (2010) "Effect of isolated fractions of *Harpagophytum procumbens* D.C. (devil's claw) on COX-1, COX-2 activity and nitric oxide production on whole-blood assay". *Phytother Res* 24, 1365-1369.

Betancor-Fernández A., Pérez-Gálvez A., Sies H., Stahl W. (2003) "Screening pharmaceutical preparations containing extracts of turmeric rhizome, artichoke leaf, devil's claw root and garlic or salmon oil for antioxidant capacity". *J Pharm Pharmacol* 55, 981-986.

Boukemara H., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Bendjeddou D., El Benna J., Marie J.-C. (2016) "*Anvillea garcinii* extract inhibits the oxidative burst of primary human neutrophils". *BMC Complement Altern Med* 16, 433. doi: 10.1186/s12906-016-1411-1417.

Chrubasik S., Junck H., Breitschwerdt H., Conradt C., Zappe H. (1999) "Effectiveness of *Harpagophytum* extract WS1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: a randomised, placebo-controlled, double-blind study". *Eur J Anesthesiol* 16, 118-129.

Clausen J., Albrecht H., Mathie R.T. (2013) "Veterinary clinical research database for homeopathy: Placebo-controlled trials". *Complement Ther Med* 21, 115-120.

European Pharmacopoeia. (2005) "Devil's claw root". 5th edition, monograph 1095, p. 1401.

Gagnier J.L., Chrubasik S., Manheimer E. (2004) "*Harpagophytum procumbens* for osteoarthritis and low back pain: A systematic review". *BMC Complem Altern M* 4, 13.

Grant L., McBean D.E., Fyfe L., Warnock A.M. (2007) "A review of the biological and potential therapeutic actions of *Harpagophytum procumbens*". *Phytother Res* 21, 199-209.

Grant L., McBean D.E., Fyfe L., Warnock A.M. (2009) "The inhibition of free radical generation by preparations of *Harpagophytum procumbens* in vitro". *Phytother Res* 23, 104-110.

Huang C.-F., Lin S.-S., Liao P.-H., Young S.-C., Yang C.-C. (2008) "The immunopharmaceutical effects and mechanisms of herb medicine". *Cell Mol Immunol* 5, 23-31.

Kori S., Namiki H., Suzuki K. (2009) "Biphasic regulation of polymorphonuclear leukocytes spreading by polyphenolic compounds with pyrogallol moieties". *Int Immunopharmacol* 9, 1159-1167.

Liu Y., Song M., Che T.M., Almeida J.A.S., Lee J.J., Bravo D., Maddox C.W., Pettigrew J.E. (2013) "Dietary plant extracts alleviate diarrhea and alter immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *Escherichia coli*". *J Anim Sci* 91, 5294-5306.

Liu Y., Che T.M., Bravo D., Pettigrew J.E. (2012) "Anti-inflammatory effects of several plant extracts on porcine alveolar macrophages in vitro". *J Anim Sci* 90, 2774-2783.

Loew D., Möllerfeld J., Schrödter A., Puttkammer P., Kaszkin M. (2001) "Investigations on the pharmacokinetic properties of *Harpagophytum* extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis in vitro and ex vivo". *Clin Pharmacol Ther* 69, 356-364.

Manda-Handzlik A., Demkow U. (2015) "Neutrophils: The role of oxidative and nitrosative stress in health and disease". *Adv Exp Med Biol* 857, 51-60.

Nastasijević B., Lazarević-Pašti T., Dimitrijević-Branković S., Pašti I., Vujačić A., Joksić G., Vasić V. (2012) "Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts". *J Pharm Biomed Anal* 66, 191-196.

Netter P., Bannwarth B., Royer-Morrot M.J. (1989) "Recent findings on the pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in synovial fluid". *Clin Pharmacokinet* 17, 145-162.

Parij N., Nagy A.-M., Fondu P., Nève J. (1998) "Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils". *Eur J Pharmacol* 352, 299-305.

Tsumbu CN, Deby-Dupont G, Tits M, Angenot L, Frederich M, Kohnen S, Mouithys-Mickalad A, Serteyn D, Franck T. (2012) "Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extracts on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase". *Int J Mol Sci* 13, 628-650.

Varga Z., Ujhelyi L., Kiss A., Balla J., Czompa A., Antus S. (2004) "Effect of silybin on phorbol myristate acetate-induced protein kinase C translocation, NADPH oxidase activity and apoptosis in human neutrophils". *Phytomedicine* 11, 206-212.

van Wyk B.E. (2008) "A broad review of commercially important southern African medicinal plants". *J Ethnopharmacol* 119, 342-345.