

# I bisfosfonati: caratteristiche chimiche, effetti biologici scheletrici ed effetti extra-scheletrici

## *The bisphosphonates: chemical characteristics, skeletal biological effects and extra-skeletal effects*

A. Corrado, F.P. Cantatore

Clinica Reumatologica "Mario Carrozzo", Università degli Studi di Foggia

### SUMMARY

*Bisphosphonates (BP) are pharmacological compounds whose the most important biological effect is the reduction of bone remodelling, explaining the reason for their use in pathological conditions characterised by an increased bone resorption, such as osteoporosis, Paget's disease of bone, malign hypercalcemia during myeloma and osteolytic bone metastasis. Nevertheless there are several experimental evidence that BP possess different extra-skeletal biological effects, ranging from analgesic properties, anti-inflammatory and pro-inflammatory effects and the capacity of modifying the biological activity of cells other than osteoblasts and osteoclasts, such as the immune system cells and other cells of mesenchymal origin. Several data report the beneficial effects of BP as anti-inflammatory agents in different inflammatory chronic articular diseases, which make BP suitable drugs for treatment of pathologies other than bone disease.*

Reumatismo, 2005; 57(3):142-153

### INTRODUZIONE

I bisfosfonati (BF) sono analoghi strutturali del pirofosfato inorganico, il più semplice dei polifosfati, una sostanza normalmente presente nei liquidi biologici e capace di inibire l'aggregazione e la dissoluzione dei cristalli di fosfato di calcio in vitro (1) e la calcificazione ectopica in vivo (2).

Il pirofosfato è prodotto in varie reazioni biosintetiche dell'organismo; previene la calcificazione dei tessuti molli e svolge un ruolo di regolazione nei processi di mineralizzazione ossea. Esso conserva le sue proprietà farmacologiche solo se somministrato per via parenterale, mentre se è somministrato oralmente viene degradato dalle pirofosfatasi contenute nell'orletto a spazzola delle cellule epiteliali di rivestimento del tratto gastrointestinale. Grazie alla sostituzione dell'atomo

di ossigeno contenuto nella struttura di base del pirofosfato (P-O-P) con un atomo di carbonio (P-C-P), si ottengono dei composti resistenti all'attività enzimatica delle pirofosfatasi, al calore ed a molti reagenti chimici, pur conservando le proprietà chimico-fisiche proprie del pirofosfato (Fig. 1). In ragione della presenza di due legami carbonio-fosforo sullo stesso atomo di carbonio, le molecole contenenti tale legame vengono definite bisfosfonati geminali o, più semplicemente e correntemente, bisfosfonati.

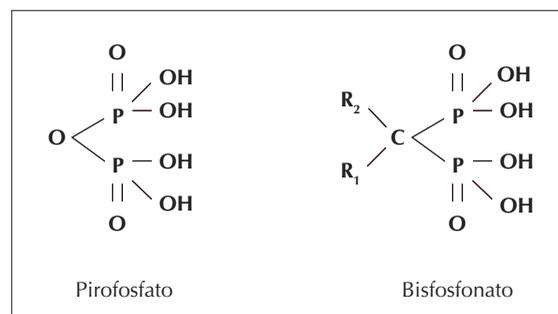


Figura 1 - Formule di struttura del pirofosfato e del bisfosfonato.

Indirizzo per la corrispondenza:  
Dott. Francesco Paolo Cantatore  
Piazza Don Antonio Bello, 2  
70037 Ruvo di Puglia, Bari  
E-mail: fp.cantatore@unifg.it

Gli effetti dei BF sono simili a quelli del pirofosfato, in quanto inibiscono la formazione, l'aggregazione e la dissoluzione dei cristalli di calcio fosfato; hanno inoltre un'elevata affinità per la matrice ossea mineralizzata e sono in grado di inibire il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti. È quest'ultimo effetto biologico a costituire il razionale dell'impiego di tali composti nelle condizioni cliniche caratterizzate dall'aumento dei processi di riassorbimento osseo, come il morbo di Paget, l'ipercalcemia maligna, le metastasi osteolitiche, il mieloma, l'iperparatiroidismo primitivo e secondario e l'osteoporosi ad alto turn-over.

### CARATTERISTICHE FISICO-CHIMICHE

Gli effetti dei BF sono in gran parte dipendenti dalla loro affinità per il calcio ossalato ed il calcio fosfato, a cui si legano fortemente; la particolare struttura chimica P-C-P è di essenziale importanza per tale legame e di conseguenza per l'affinità

con il tessuto osseo, ed interviene inoltre nei meccanismi di azione molecolare dei BF, soprattutto quelli riguardanti l'attività antiriassorbitiva. Come il pirofosfato, anche i BF sono molto efficaci nell'impedire in vivo la calcificazione dei tessuti molli e prevengono la calcificazione indotta sperimentalmente delle arterie, del rene, della cute e di molti altri tessuti (3, 4); impediscono la formazione di calcoli renali indotti da dosi tossiche di vitamina D e del tartaro orale quando somministrati localmente (5), tanto che in alcuni paesi sono i principali agenti utilizzati come antitartaro per i dentifrici. Il grado di attività dell'intera molecola dipende dal tipo di catene laterali legate alla struttura P-C-P (6). Mediante l'esterificazione del fosfato e per mezzo di diversi tipi di catene laterali legate all'atomo di carbonio, sono state sintetizzate numerose molecole, ciascuna delle quali presenta caratteristiche fisico-chimiche e biologiche diverse, con un particolare profilo di attività (Fig. 2). Per esempio, l'azione inibente il riassorbimento osseo è in parte aumentata inserendo un gruppo ossidrilico sull'ato-

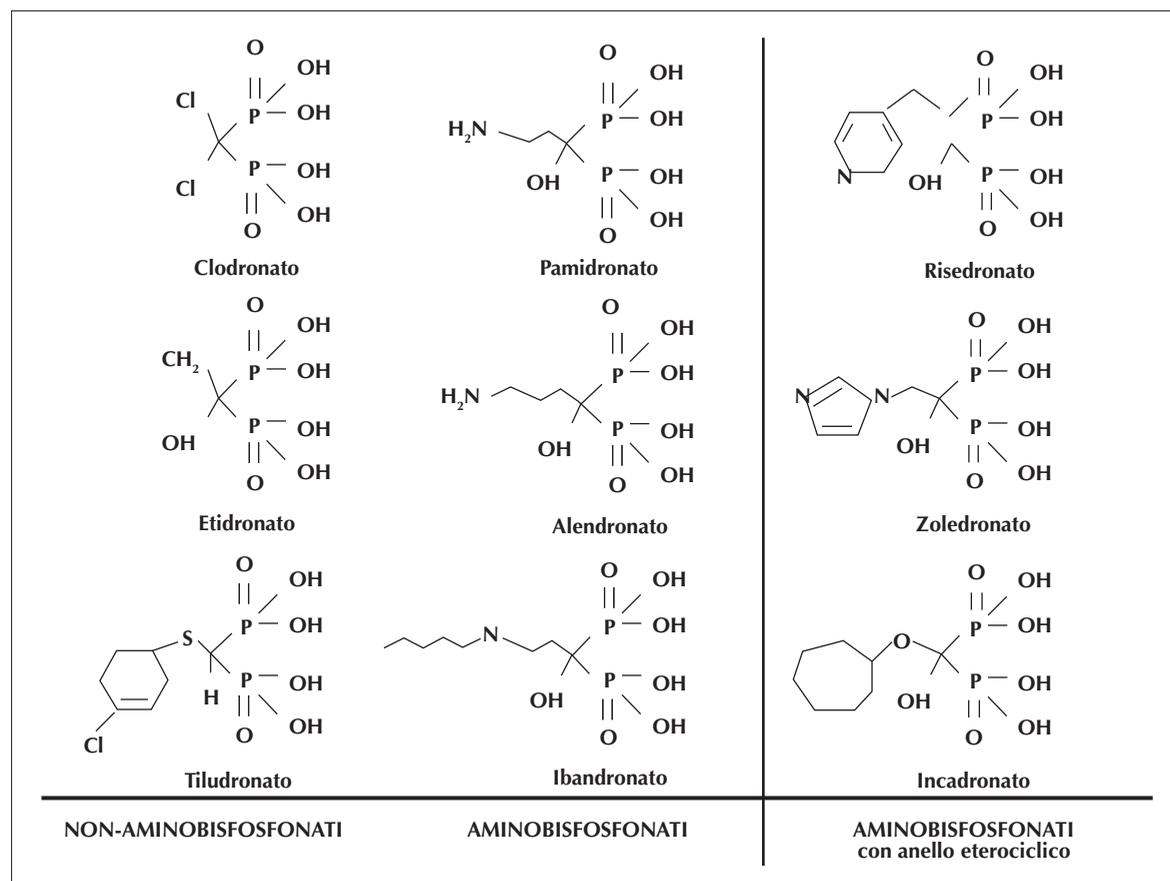


Figura 2 - Molecole di sintesi derivate dal bisfosfonato.

mo di carbonio in posizione R1 (etidronato) (7, 8); allungando la catena alifatica in R2, la potenza farmacologica aumenta per ogni atomo di carbonio aggiunto, fino ai 9 atomi di carbonio (9), ma un ulteriore allungamento determina una riduzione dell'attività. Dalla fine degli anni '80 sono stati sintetizzati composti con attività antiriassorbitiva sempre maggiore, ottenuti mediante la sostituzione della sola catena laterale R2 e mantenendo invariata la catena laterale R1, che ne determina il grado di affinità con i cristalli di idrossiapatite. Fondamentale è stata l'introduzione nella struttura dei BF di gruppi amminici, con la conseguente formazione di aminoderivati che costituiscono quasi una classe distinta, sia per efficacia che per meccanismo d'azione molecolare, e per i quali la proprietà antiriassorbitiva è dissociata dall'inibizione della mineralizzazione; tra questi, l'alendronato e il pamidronato, che sono da 10 a 100 volte più potenti rispetto a clodronato ed etidronato. I BF che contengono un gruppo azotato terziario (ibandronato ed olpadronato) risultano ancora più attivi. I BF con maggiore capacità anti-riassorbitiva sono quelli, come risedronato e zoledronato, che contengono un gruppo amminico all'interno di un anello eterociclico, e possiedono una attività 10.000 volte più potente rispetto all'etidronato in alcuni modelli sperimentali. A tutt'oggi sono state sintetizzate alcune centinaia di BF; di questi, solo una dozzina è utilizzata nella pratica clinica.

## EFFETTI BIOLOGICI SCHELETRICI

### *Meccanismo d'azione tissutale e cellulare*

Si riteneva in passato che l'effetto inibente il riassorbimento osseo esercitato dai BF fosse correlato esclusivamente alle loro proprietà fisico-chimiche. L'ipotesi più accreditata sosteneva che l'etidronato, il primo dei BF ad essere stato studiato ampiamente in vivo, legandosi alla superficie dei cristalli di idrossiapatite dell'osso ne determinasse la resistenza alla dissoluzione chimica ed enzimatica. Studi successivi su composti più potenti hanno smentito questa ipotesi. I dosaggi di BF capaci di determinare l'inibizione in vivo del riassorbimento osseo sono anche milioni di volte inferiori rispetto a quelli necessari per bloccare, sia in vitro che in vivo, la dissoluzione dei cristalli di idrossiapatite. Si ritiene pertanto che l'effetto chimico-fisico dei BF non giochi alcun ruolo nella loro attività di blocco dell'attività osteoclastica di riassorbimento osseo. I meccanismi d'azione dei BF in realtà non sono a tutt'og-

gi completamente conosciuti e chiariti, anche se sin dai primi studi effettuati è apparso evidente che il principale bersaglio cellulare di questi composti è rappresentato dall'osteoclasta. Si tratta di una cellula multinucleata, derivante dalla linea monocito-macrofagica, che svolge un ruolo di primaria importanza nei processi di rimaneggiamento osseo e dell'omeostasi fosfo-calcica, in quanto deputata al disfacimento dei cristalli di idrossiapatite e al riassorbimento della matrice organica. È stato ampiamente dimostrato che i BF agiscono sugli osteoclasti, determinandone alterazioni morfologiche e funzionali, espresse dalla perdita dell'orletto a spazzola e dei vacuoli citoplasmatici tipici della fase attiva di riassorbimento osseo (10, 11), dalla riduzione della produzione di acido lattico, dell'accumulo protonico, della sintesi di enzimi lisosomiali e di prostaglandine, di pirofosfatasi e della fosfatasi acida, fondamentali per l'attività fagocitaria dell'osteoclasta. Non è stato ancora definitivamente chiarito se i BF agiscano direttamente o indirettamente tramite cellule che regolano il reclutamento e l'attività degli osteoclasti. Sono stati ipotizzati vari meccanismi d'azione capaci di spiegare l'effetto inibente dei BF sull'osteoclasta.

### *Inibizione dell'attività degli osteoclasti maturi*

L'inibizione diretta sull'attività osteoclastica è suggerita, in vivo, dalla scomparsa dell'orletto a spazzola (ruffler border) che è espressione delle cellule in fase di attività. L'alendronato induce in vitro alterazioni morfologiche e funzionali sugli osteoclasti che perdono la capacità di estrudere protoni (probabilmente per blocco di una pompa protonica ATP dipendente) e la capacità di acidificare il mezzo circostante, condizione essenziale per la dissoluzione dei cristalli di idrossiapatite e quindi per la funzione di riassorbimento osseo. Per alcuni BF è necessaria l'internalizzazione del farmaco nella cellula; è stato dimostrato che il tiludronato distrugge la struttura ad anello di actina, e che per tale azione è necessaria la captazione intracellulare del farmaco (che avviene per mezzo di un meccanismo di transitosi). In cellule osteoclastiche alterate, che sono prive della capacità di fagocitare, il contatto con BF non altera l'anello di actina (12).

### *Incremento dei processi di apoptosi degli osteoclasti*

L'apoptosi è il meccanismo fisiologico di morte degli osteoclasti, la cui durata di vita è di 2-4 settimane *in vivo* e 2 settimane circa *in vitro*. Si tratta di un meccanismo di morte cellulare program-

mata, differenziabile dalla necrosi cellulare per alcune specifiche caratteristiche morfologiche e biochimiche, quali la condensazione di cromatina, la frammentazione nucleare e la segmentazione internucleosomiale endonucleasi-mediata del DNA. Segni evidenti di apoptosi sono stati osservati in cellule murine simil macrofagiche (J774 e RAW 264) dopo trattamento con aminobisfosfonati (pamidronato, alendronato e ibandronato) (13); il clodronato si è rivelato meno potente, mentre l'etidronato sembra non indurre apoptosi. Ciò suggerisce un differente meccanismo d'azione tra amino e non amino-BF.

#### ***Inibizione del reclutamento e della formazione di nuovi osteoclasti***

I BF possono esplicare il loro effetto antiriassorbitivo agendo non solo sugli osteoclasti già maturi, ma anche sui precursori osteoclastici di origine midollare. Riguardo a tale possibile meccanismo d'azione esistono evidenze sperimentali, sia *in vivo* che *in vitro*, alquanto controverse. In alcuni studi è stato verificato che il trattamento con BF stimola il reclutamento osteoclastico (6, 14), ma tale dato non è stato confermato; in numerosi modelli sperimentali, infatti, i BF inibiscono la formazione di osteoclasti da precursori midollari (15-19). Tale ipotesi è ulteriormente sostenuta dall'osservazione che dopo somministrazione endovenosa di BF in casi di ipercalcemia maligna, la captazione scheletrica del farmaco risulta completa in 6 ore, ma l'effetto farmacologico massimo sul tessuto osseo si osserva solo dopo 2 giorni (20). Tale tipo di farmacocinetica si spiega con un'inibizione del reclutamento di nuovi osteoclasti, meccanismo che necessita di più tempo per determinare l'effetto biologico antiriassorbitivo. In diversi studi è stato dimostrato che l'inibizione del reclutamento di nuovi osteoclasti si osserva solo in presenza di osteoblasti (13, 21-23), suggerendo l'ipotesi che le cellule bersaglio dei BF siano proprio gli osteoblasti (24).

#### ***Effetti sugli osteoblasti***

Recentemente è emerso un numero sempre maggiore di dati a favore dell'ipotesi che in realtà sia l'osteoblasta la reale cellula bersaglio dei BF, tramite la quale questi composti produrrebbero il loro effetto sugli osteoclasti. I BF influenzano il metabolismo osteoblastico (25-29), pur con effetti variabili, a volte anche contrastanti, a seconda del tipo di farmaco utilizzato e dei diversi modelli sperimentali.

Essi impediscono la proliferazione degli osteoblasti (30) e riducono la secrezione osteoblastica di svariati fattori solubili (15, 31, 32), alcuni dei quali capaci di regolare sia l'osteoclastogenesi che l'attività osteoclastica (15, 23), come per esempio l'IL-6, citochina con attività osteoclastogenica e proinfiammatoria (33). In seguito è stato confermato che alcuni BF (pamidronato e zoledronato) inibiscono anche la proliferazione di altri tipi cellulari, come linfociti, macrofagi, cellule mielomatose e cellule derivanti da carcinoma polmonare; nonostante ciò, essi incrementano, negli osteoblasti, la sintesi proteica totale cellulare, la secrezione di collagene di tipo I e l'attività della fosfatasi alcalina.

Queste osservazioni suggeriscono un'azione favorente la differenziazione osteoblastica, con passaggio dallo stadio proliferativo allo stadio maturativo, tipico della fase di deposizione della matrice (34). Anche l'etidronato inibisce *in vitro* la proliferazione osteoblastica, a concentrazioni tuttavia molto maggiori rispetto a pamidronato e zoledronato, probabilmente a causa di un differente meccanismo d'azione; mentre l'etidronato agisce chelando gli ioni bivalenti nel mezzo di coltura, per il pamidronato e la zoledronato intervengono altri meccanismi che coinvolgono direttamente il metabolismo cellulare (35).

Alcuni BF stimolano la proliferazione di cellule progenitrici osteoblastiche di derivazione midollare (26) ed inibiscono l'apoptosi di osteociti ed osteoblasti (29). Tali contrastanti effetti sulla proliferazione cellulare possono essere spiegati dalle differenze chimico-strutturali dei vari BF utilizzati, dalle differenti concentrazioni utilizzate, dalla durata del trattamento e dai differenti tipi cellulari su cui ne vengono valutati gli effetti. Nonostante vi sia una chiara evidenza *in vitro* degli effetti che i BF esercitano sulla cellula osteoblastica, la loro reale importanza *in vivo* è ancora incerta. Infatti non è ben chiaro quale dei due meccanismi (quello diretto, sugli osteoclasti, e quello indiretto, sugli osteoblasti) sia presente *in vivo* o, se presenti entrambi, quale dei due sia prevalente (35).

#### ***Meccanismo d'azione molecolare***

Studi più recenti sembrano aver chiarito in gran parte le modalità con cui i BF agiscono a livello molecolare; in particolare sono stati individuati due distinti meccanismi d'azione a livello intracellulare, che sembrano dipendere dalle caratteristiche chimiche dei composti in esame.

Il clodronato, l'etidronato ed altri BF che hanno

una struttura chimica più simile al pirofosfato e che non contengono nella catena laterale R2 un residuo azotato, vengono incorporati in analoghi tossici dell'ATP, non idrolizzabili e quindi metabolicamente inutilizzabili. L'enzima chiave che determina l'incorporazione dei BF in nucleotidi non utilizzabili (tramite la sostituzione di un gruppo pirofosforico) è un'aminoaciltransferasi della classe II<sup>c</sup>. L'effetto finale di tale sostituzione è, da una parte, l'accumulo intracellulare di analoghi dell'ATP non utilizzabili, che esercitano un effetto potenzialmente tossico, dall'altra il depauperamento dei depositi di ATP, l'inibizione della sintesi proteica e di altre reazioni ATP dipendenti, con conseguente morte cellulare. I BF che agiscono con questo meccanismo hanno corte catene laterali R1 ed R2 (ad eccezione del tiludronato) e presentano un'attività anti-osteoclastica relativamente minore rispetto ad altri composti (36).

I BF con attività anti-risorbitiva più potente sono quelli contenenti un gruppo aminico nella catena laterale R2 (come l'alendronato) e non sono metabolizzati dalla aminoaciltransferasi a causa della conformazione sterica della stessa catena laterale, che essendo più grande rispetto al sito attivo dell'enzima ne impedisce il legame. Di conseguenza questi composti hanno un meccanismo molecolare d'azione diverso. Da studi preliminari era già emerso che questi BF potessero inibire una o più tappe della catena metabolica che porta alla sintesi del colesterolo ed in seguito è stato chiarito che effettivamente i BF contenenti gruppi amminici interferiscono con il metabolismo del mevalonato, un composto intermedio della catena biosintetica del colesterolo, che viene trasformato in lipidi isoprenoidi (isopentenilpirofosfato, farnesilpirofosfato, geranilgeranilpirofosfato). Tali lipidi sono essenziali per le modificazioni post-traduzionali, dette di prenilazione, dei alcune proteine, in particolare delle GTP binding protein (GTPasi) tra cui Ras, Rho e Rac (36, 37). Le GTPasi sono importanti proteine di segnale che regolano una grande varietà di processi cellulari, fondamentali per la funzione degli osteoclasti, la cui modificazione post-traduzionale è essenziale per la loro localizzazione nelle membrane cellulari e in definitiva per la loro funzione biologica (38-40). L'inibizione della prenilazione causa profonde modifiche della morfologia cellulare, altera i processi di proliferazione e di trasduzione dei segnali, determinando come effetto finale la morte cellulare per apoptosi.

## EFFETTI BIOLOGICI EXTRASCHELETRICI

I BF, oltre a prevenire e a ridurre la perdita di massa ossea in diverse condizioni patologiche, possiedono effetti antiinfiammatori e antiartritici, evidenziati sperimentalmente in modelli animali e umani (41, 42). In realtà, gli effetti biologici dei BF sono estremamente variabili e spesso discordanti, differendo in base al modello sperimentale, alla modalità di somministrazione, alla struttura chimica del composto in esame e alla concentrazione impiegata, con differenze notevoli tra amino e non amino-bisfosfonati, probabilmente a causa del differente meccanismo d'azione, come dimostrato in numerosi modelli sperimentali *in vitro* ed *in vivo* (41).

### *Effetti anti-infiammatori*

Diversi BF, come il pamidronato, inducono in acuto la generazione di citochine pro-infiammatorie da parte di alcune linee cellulari che si traduce clinicamente con una reazione di fase acuta a carattere temporaneo; in realtà l'effetto dell'utilizzo a lungo termine dei BF provoca una serie di effetti di tipo prevalentemente anti-infiammatorio, potenzialmente sfruttabili nella pratica clinica.

Oltre agli osteoclasti, anche i macrofagi sono sensibili all'azione dei BF, probabilmente a causa della loro origine comune: ciò è importante se si considera la regolazione locale e sistemica svolta dalle cellule della linea monocito-macrofagica sui processi infiammatori, mediante la produzione di citochine.

Pamidronato e clodronato interferiscono con la funzione dei macrofagi inibendo la produzione di monossido di azoto (NO), in maniera dose-dipendente, con conseguente effetto anti-infiammatorio.

Come detto in precedenza, i non amino-bisfosfonati, come il clodronato e l'etidronato, che possiedono una struttura più simile al pirofosfato, sono incorporati in analoghi tossici, non idrolizzabili, dell'ATP. *In vitro*, l'analogo non idrolizzabile dell'ATP derivante dal clodronato è l'AppcC112p (43), che riduce la produzione macrofagica di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e NO ed induce l'apoptosi delle cellule derivanti dalla linea monocito-macrofagica *in vitro* ed *in vivo* (44, 45). Tali effetti sono in parte dipendenti dall'inibizione del legame tra il fattore di trascrizione Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) ed il DNA macrofagico (46) ed in parte da eventi citoplasmatici che coinvolgono la proteina-kinasi C (45) e gli ioni ferro (47). Oltre ai macrofagi, i BF influenzano l'attività di altre cellule infiammatorie; per esempio, il clodronato inibisce *in vitro* la produzione di

radicali liberi dell'ossigeno prodotti dai polimorfonucleati, implicati nell'induzione e nel potenziamento della risposta infiammatoria che si osserva nei pazienti con artrite reumatoide (48) e riduce la produzione di diversi mediatori pro-infiammatori (46) e l'espressione delle molecole di adesione nelle cellule del lining sinoviale (49).

Da qualche anno è divenuto oggetto di numerosi studi l'effetto dei BF sull'angiogenesi, anche questo potenzialmente sfruttabile nella pratica clinica per il ruolo svolto dai processi neoangiogenetici nell'infiammazione e nella crescita tumorale. È stato dimostrato infatti che alcuni BF possiedono spiccate attività anti-neoangiogenetiche *in vivo* ed *in vitro* i cui meccanismi non sono stati ancora del tutto chiariti e che implicano l'inibizione diretta dell'attività proliferativa delle cellule endoteliali, l'inibizione di fattori di crescita endoteliali (Endothelial Growth Factor) e delle metalloproteinasi (MMP-2 e MMP-14), che stimolano la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali (50). L'attività anti-neoangiogenetica posseduta da alcuni BF sembra essere strettamente correlata ad una attività di tipo anti-tumorale che si esplica attraverso la modulazione dell'apoptosi cellulare e dell'espressione di alcune molecole di adesione (51, 52).

### **Effetti antiinfiammatori *in vivo***

Gli effetti positivi esercitati da alcuni amino-BF sui mediatori dell'infiammazione e sul metabolismo osseo hanno suggerito la possibilità del loro impiego ai fini della soppressione dell'infiammazione e della prevenzione del danno osteo-articolare nelle malattie infiammatorie croniche articolari, quali l'artrite reumatoide. Le proprietà anti-infiammatorie di diversi BF sono state valutate *in vivo* sia in differenti tipi di modelli animali che nell'uomo. L'artrite da adiuvante e l'artrite collagene-indotta sono modelli animali sperimentali che per la loro similarità con i quadri clinici e istopatologici dell'artrite reumatoide sono ampiamente utilizzati nella valutazione degli effetti di farmaci antireumatici, inclusi i BF (53). Gli effetti differenti e spesso contraddittori che BF mostrano nell'artrite animale dipendono probabilmente dal tipo di composto e dal dosaggio, da un lato, e dalle differenze patogenetiche fra i vari modelli sperimentali dall'altro. BF riducono la tumefazione articolare e gli indici umorali di flogosi in diversi modelli animali di artrite. L'induzione dell'apoptosi nei macrofagi della membrana sinoviale è stata indicata come uno dei più importanti meccanismi degli

effetti anti-artritici dei BF (43); per poter veicolare i BF direttamente all'interno dei macrofagi vengono utilizzate molecole liposomiali che sfruttano le proprietà fagocitiche dei macrofagi stessi (54). Con questa tecnica i BF vengono fagocitati dai macrofagi del lining sinoviale, ma non si può escludere che essi vengano internalizzati anche dai fibroblasti, dai condrociti e dalle cellule presentanti l'antigene dei linfonodi regionali. Il clodronato possiede effetti antiinfiammatori *in vivo* (13, 33, 55); somministrato per via endovenosa in ratti con artrite da adiuvante riduce la severità dei segni clinici ed istologici di infiammazione (56) e riduce la produzione sinoviale di TNF $\alpha$  (43, 57) e l'iperplasia delle cellule del lining sinoviale (43). Esso riduce inoltre la perdita dei proteoglicani cartilaginei nell'artrite sperimentale collagene-indotta e ciò suggerisce una potenziale azione protettiva sulla cartilagine (43), anche se l'effetto della risposta condrocitaria è in realtà sconosciuto (58).

Al contrario è stato segnalato che il clodronato somministrato a dosi elevate, e quindi potenzialmente citotossiche, esercita un effetto pro-infiammatorio ed è in grado di indurre una sinovite dopo somministrazione intraarticolare (59).

Anche l'etidronato riduce le manifestazioni infiammatorie articolari e sistemiche nell'artrite da adiuvante nel ratto (41) ed il pamidronato ritarda il danno strutturale articolare in un modello di artrite sperimentale di topi transgenici che sovraesprimono TNF $\alpha$  (60). Il 3-amino-idrossipropilidene-1,1-bisfosfonato (APD) ed il suo derivato con più potenti proprietà antiriassorbitive dimetil-APD non esercitano invece alcun effetto clinico positivo sulla severità dell'artrite da collagene nel coniglio e sono inattivi nel prevenire le alterazioni ossee secondarie al processo infiammatorio (61).

La capacità di diversi BF di inibire i processi infiammatori in modelli animali di artrite sperimentale e l'importanza del ruolo che le cellule di derivazione midollare dell'osso sub-condrale ed i monocito-macrofagi circolanti giocano nella patogenesi delle lesioni ossee e nel determinismo del danno sinoviale nelle malattie infiammatorie croniche articolari (62) rappresentano le basi teoriche per la loro potenziale utilità nella patologia umana, ma anche nell'uomo gli studi sugli effetti dei BF sull'artrite sono poco chiari e spesso contraddittori. I primi dati che riportano gli effetti benefici dei BF come agenti antiinfiammatori in un numero limitato di soggetti affetti da artrite reumatoide risale a diversi decenni fa. In seguito, un numero abbastanza considerevole di studi terapeutici ha conferma-

to la possibile indicazione all'uso dei BF nelle artriti croniche, per il loro effetto anti-infiammatorio indipendente dall'effetto anti-riassorbitivo sull'osso (48). L'infusione endovenosa di alendronato ad alto dosaggio, 40 mg al giorno per 90 giorni, in pazienti affetti da artrite reumatoide induce una significativa riduzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ,  $\beta_2$ microglobulina) ed un miglioramento clinico e bioumorale (riduzione del numero delle articolazioni tumefatte e dell'indice di Ritchie, riduzione di VES e PCR) (63). In pazienti affetti da artrite reumatoide e trattati con methotrexate e prednisolone il pamidronato somministrato alla dose di 60 mg ogni 3 mesi induce una riduzione significativa di VES e PCR e degli indici di attività di malattia (indice di Ritchie, Health Assessment Questionnaire, Visual Analogic Scale, Global Disease Activity Score) e determina un aumento della densità minerale ossea valutata a livello lombare, rispetto a pazienti sottoposti allo stesso regime terapeutico ma non trattati con pamidronato (64); inoltre riduce la produzione di IL1 $\beta$  da parte dei monociti periferici (64). Anche una singola infusione di pamidronato migliora il quadro clinico (indice di Ritchie, numero di articolazioni tumefatte) e laboratoristico (VES e PCR) in pazienti con artrite reumatoide (65). Lo stesso composto somministrato giornalmente per via orale ad alto dosaggio per un anno, previene la progressione del danno erosivo articolare (66). Al contrario il BF amino-idrossi-propilidene, al dosaggio di 30 mg per 48 settimane non ha alcun effetto sulla progressione del danno radiologico nell'AR (67).

Il pamidronato sembra possedere effetti terapeutici anche nelle spondiloartriti sieronegative. La somministrazione mensile del farmaco in pazienti affetti da spondilite anchilosante (SA) (30 mg al mese per i primi 3 mesi, seguiti da 60 mg al mese per 3 mesi) induce un miglioramento clinico supportato dalla riduzione superiore al 30% dell'indice di attività di malattia (BASDAI) e dalla ridotta assunzione di analgesici, ed una riduzione della VES, che persistono per i 3 mesi successivi al termine del trattamento stesso (68); i maggiori cambiamenti nei valori della VES si verificano tra il terzo ed il sesto mese di terapia, suggerendo che gli effetti antiartritici del pamidronato possano richiedere una somministrazione prolungata del farmaco. La riduzione dell'attività di malattia indotta dal pamidronato è probabilmente dose-dipendente, come indicato dalla migliore risposta clinica, in pazienti affetti da SA, all'infusione endovenosa mensile in di 60 mg del farmaco rispetto alla dose mensile di 10

mg, in termini di attività di malattia (BASDAI), severità di malattia (BASMI), dolore rachideo, mobilità, indice di funzionalità (BASFI) (69), con un miglioramento anche delle sinoviti periferiche, quando presenti, senza differenze tra i due dosaggi. Somministrazioni endovenose di pamidronato ad intervalli più brevi nelle spondiloartriti sono probabilmente più efficaci ed inducono una riduzione dell'attività di malattia più durevole (70), insieme al miglioramento delle lesioni radiologiche valutate mediante Risonanza Magnetica Nucleare, consistenti nella riduzione dell'edema osseo periarticolare, nella riduzione di aree erosive focali e della presa di contrasto (gadolinio) nelle articolazioni periferiche (misure che permettono la valutazione della severità dell'infiammazione) (70).

BF meno potenti come l'etidronato non hanno alcun effetto sull'attività di malattia in pazienti affetti da artrite reumatoide (65); tuttavia, nonostante le proprietà antiinfiammatorie siano notevolmente più marcate per gli amino-BF, anche alcuni composti non contenenti gruppi aminici hanno mostrato attività anti-flogogena. In particolare il clodronato somministrato per via endovenosa in pazienti affetti da artrite reumatoide al dosaggio di 300 mg/die per 7 giorni consecutivi determina un miglioramento dei parametri clinici e di laboratorio (71) e riduce i livelli circolanti di alcune citochine proinfiammatorie, in particolare IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ ,  $\beta_2$ microglobulina (72). Una singola somministrazione intraarticolare di clodronato in pazienti con artrite reumatoide induce una significativa riduzione numerica dei macrofagi del lining sinoviale (73), con un effetto selettivo sui sinoviociti di tipo A macrofago-like, che sono una delle più importanti fonti di sintesi di citochine, con conseguente riduzione della produzione locale di diversi fattori pro-infiammatori, quali IL-1, TNF $\alpha$  e fattori chemiotattici (74), senza alcun effetto sui linfociti B, plasmacellule e sinoviociti di tipo B fibroblasto-like. Il trattamento intra-articolare con clodronato determina inoltre una down-regulation dell'espressione delle molecole di adesione ICAM1 ed VCAM1 nelle cellule del lining sinoviale, che correla con la riduzione numerica macrofagica (49). La riduzione dei macrofagi indotta dal clodronato è temporanea e reversibile, dal momento che la completa ripopolazione macrofagica dopo il trattamento richiede da 2 a 4 settimane (59).

### ***Effetti pro-infiammatori***

In seguito alla somministrazione di amino-BF si possono manifestare effetti collaterali, rappresen-

tati da rialzo transitorio della temperatura corporea, mialgie e cefalea, associate o meno ad alcune modificazioni bioumorali (aumento degli indici di flogosi, riduzione della conta leucocitaria, linfocitopenia) (75-81) che possono essere considerati espressione di una reazione di fase acuta (82). Gli amino BF causano l'insorgenza di una reazione di fase acuta solo dopo la prima somministrazione, mentre le somministrazioni successive sono scevre da tale complicità. Tale reazione è dose-dipendente, insorge nelle 10-12 ore seguenti alla somministrazione del farmaco, raggiunge il picco di intensità dopo 28-36 ore e scompare dopo 3-4 giorni nonostante il trattamento venga protratto (82); non è legata al tipo ed alla severità della malattia ossea di base (80), anche se la risposta dei soggetti sani può essere diversa rispetto ai pazienti con elevata attività osteoclastica (83). La reazione di fase acuta provocata dagli amino-BF è probabilmente attribuibile ad un aumento temporaneo della produzione di IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  dai monociti-macrofagi o dagli osteoclasti (82, 84), ma i risultati degli studi *in vitro* ed *in vivo* a tal proposito sono ampiamente discordanti. Studi *in vivo* hanno dimostrato che una singola somministrazione di pamidronato (60 mg) non modifica i livelli sierici di IL-1 (75); al contrario è stato confermato un incremento dei livelli di IL-6 e TNF $\alpha$  indotti dal pamidronato e dal dimetilaminoidrossipropilidene (75, 80, 85).

Nessuna delle suddette alterazioni è stata osservata in seguito a somministrazione di clodronato (86), che al contrario sembrerebbe avere effetti opposti. È stato dimostrato (87) che gli amino-bisfosfonati incrementano l'attività della istidina-decarbossilasi, un enzima che catalizza la formazione dell'istamina, potente mediatore della flogosi, e alcuni di questi composti possono incrementare il numero di macrofagie e granulociti. La linfopenia che si può osservare nelle infusioni endovenose di amino-BF potrebbe essere la conseguenza di una disregolazione dell'espressione di molecole di adesione, con conseguente redistribuzione dei linfociti ad alcuni distretti vascolari, come per esempio il piccolo intestino (88).

### ***BF e osteoartrosi***

Nell'ottica del possibile utilizzo

composti amino-derivati, che testimoniano un'azione di tali composti non solo sulle cellule del tessuto osseo, ma anche su cellule del sistema immunitario, con un effetto "immunomodulante", influenzando sulla produzione di citochine pro ed anti-infiammatorie e modificando l'espressione di molecole coinvolte nei processi immuni e nella genesi della risposta infiammatoria. Nonostante l'identificazione esatta delle cellule bersaglio ed i mecca-

nismi di interferenza dei BF con le risposte immunitarie ed infiammatorie non siano ancora del tutto chiariti, i risultati degli studi clinici sull'effetto dei BF nelle malattie infiammatorie croniche articolari mostrano dei risultati incoraggianti, sia sul controllo della flogosi che sulla progressione del danno articolare ed osseo, rendendo plausibile l'ipotesi di un più ampio utilizzo di tali agenti terapeutici nella pratica clinica.

#### RIASSUNTO

I Bisfosfonati (BF) sono agenti farmacologici che per le loro spiccate attività anti-riassorbitive sono utilizzati per il trattamento delle malattie caratterizzate da un elevato turnover osseo. Nel corso degli anni sono state sintetizzate nuove molecole con attività anti-riassorbitiva sempre maggiore. I composti contenenti nella loro struttura un gruppo amminico (amino-BF) oltre ad una più spiccata attività anti-riassorbitiva, posseggono una serie di effetti a carattere anti-infiammatorio, potenzialmente sfruttabili nella pratica clinica. Diversi studi effettuati utilizzando i BF nel trattamento di malattie infiammatorie croniche articolari ha rivelato risultati incoraggianti sul controllo della flogosi, rendendo plausibile un utilizzo più ampio di tali molecole nella pratica clinica.

**Parole chiave** - Bisfosfonati, osteoclasti, infiammazione, osteoartrite, artrite.

**Key words** - *Bisphosphonates, osteoclasts, inflammation, osteoarthritis, arthritis.*

#### BIBLIOGRAFIA

1. Fleisch H, Maerki J, Russell RG. Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 122: 317-20.
2. Schibler D, Russell RG, Fleisch H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin Sci* 1968; 35: 363-72.
3. Fleisch HA, Russell RG, Bisaz S, Muhlbauer RC, Williams DA. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest* 1970; 1: 12-8.
4. Rosenblum IY, Black HE, Ferrell JF. The effects of various diphosphonates on a rat model of cardiac calciphylaxis. *Calcif Tissue Res* 1977; 23: 151-9.
5. Briner WW, Francis MD, Widder JS. The control of dental calculus in experimental animals. *Int Dent J* 1971; 21: 61-72.
6. Muhlbauer RC, Bauss F, Schenk R, Janner M, Bosies E, Strein K, et al. BM 21.0955, a potent new bisphosphonate to inhibit bone resorption. *J Bone Miner Res* 1991; 9: 1003-11.
7. Reitsma PH, Bijvoet OL, Frijlink WB, Vismans FJ, van Breukelen FJ. Pharmacology of disodium (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1, 1-bisphosphonate. *Adv Exp Med Biol* 1980; 128: 219-27.
8. Reitsma PH, Bijvoet OL, Verlinden-Ooms H, Weepals LJ. Kinetic studies of bone and mineral metabolism during treatment with (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1-bisphosphonate (APD) in rats. *Calcif Tissue Int* 1980; 32: 145-57.
9. Shinoda H, Adamek G, Felix R, Fleisch H, Schenk R, Hagan P. Structure-activity relationships of various bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 87-99.
10. Jung A, Mermillod B, Schenk R, Courvoisier B, Burkhardt P, Epiney J, et al. [Treatment of 10 cases of symptomatic Paget's disease with etidronate (EHDP)]. *Schweiz Med Wochenschr* 1976; 106: 1667-73.
11. Flanagan AM, Chambers TJ. Dichloromethylenebisphosphonate (Cl2MBP) inhibits bone resorption through injury to osteoclasts that resorb Cl2MBP-coated bone. *Bone Miner* 1989; 6: 33-43.
12. Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S. A possible mechanism of specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone* 1995; 17: 137-44.
13. Makkonen N, Hirvonen MR, Teravainen T, Savolainen K, Monkkonen J. Different effects of three bisphosphonates on nitric oxide production by raw 264 macrophage-like cells in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 1097-102.
14. Marshall MJ, Holt I, Davie MV. Osteoclast recruitment in mice is stimulated by 83-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1-bisphosphonate. *Calcif Tissue Int* 1993; 52: 21-5.
15. Vitte C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonate induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 1996; 137: 2324-33.

16. Chappard D, Alexandre C, Palle S, Vico L, Morukov BV, Rodinova SS, et al. Effects of a bisphosphonate (1-hydroxy ethylene-1,1-bisphosphonic acid) on osteoclast number during prolonged bed rest in healthy humans. *Metabolism* 1989; 38: 822-5.
17. Flanagan AM, Chambers TJ. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interaction between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 407-15.
18. Hughes DE, MacDonald BR, Russel RGG, Gowen M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term culture of human bone marrow. *J Clin Invest* 1989; 83: 1939-5.
19. Murakami N, Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, et al. Tiludronate affects polarized osteoclasts but not unpolarized one. *Bone Miner* 1994; 25: S67.
20. Nussbaum SR, Warrell RP Jr, Rude R, Glusman J, Bilezikian JP, et al. Dose response study of clodronate sodium for the treatment of cancer-associated hypercalcemia. *J Clin Oncol* 1993; 14: 268-76.
21. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse marrow cultures. *Endocrinology* 1988; 122: 1373-82.
22. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugai N, et al. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 1996; 18: 9-14.
23. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993; 91: 2004-11.
24. Vitte C, Fleisch H, Guenther HL. Osteoblasts mediate the bisphosphonate inhibition of bone resorption through synthesis of an osteoclast-inhibiting activity. *J Bone Miner Res* 1994; 9 (Suppl 1): S142.
25. Khokher MA, Dandona P. Diphosphonates inhibit human osteoblast secretion and proliferation. *Metabolism* 1989; 38: 184-7.
26. Klein B, Ben-Bassat H, Breuer E, Solomon V, Golomb G. Structurally different bisphosphonates exert opposing effects on alkaline phosphatase and mineralization in marrow osteoprogenitors. *J Cell Biochem* 1998; 68: 186-94.
27. Garcia-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farré M, Diez A, Marinoso ML, et al. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 1998; 22: 233-9.
28. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblasts precursor and mineralized nodules in murine and human bone marrow culture *in vitro* and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice *in vivo*. *Bone* 1998; 22: 455-61.
29. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Robertson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999; 104: 1363-74.
30. Khokher MA, Dandona P. Diphosphonates inhibit human osteoblast secretion and proliferation. *Metabolism* 1989; 38: 184-7.
31. Ohya K, Yamada S, Felix R, Fleisch H. Effect of bisphosphonates on prostaglandin synthesis by rat bone cells and mouse calvaria in culture. *Clin Sci* 1985; 69: 403-11.
32. Stronski SA, Bettscheu-camin L, Wetterwald A, Felix R, Trechsel U, Fleisch H. Bisphosphonates inhibit 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced increase of osteocalcin in plasma of rats *in vivo* and in culture medium. *Calcif Tissue Int* 1988; 42: 248-54.
33. Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, Girasole G. Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol* 1998; 27: 38-41.
34. Lian JB, Stein GS, Canalis E, Robey PG, Boskey AD. Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. *In: M.J. Favus (ed), Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 1999; 14-29.
35. Rehinolz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 2000; 60: 6001-7.
36. Russel RGG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999; 97: 97-106.
37. Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Monkkonen J, et al. Molecular mechanism of action of bisphosphonates. *Bone* 1999; 24: S73-S79.
38. Zallone A, Faccio R, Zamboni G. I bisfosfonati: gruppi di molecole con diversi effetti intracellulari e applicazioni cliniche. *Update on Bisfosfonati* 1999; 6: 3-5.
39. Marshall C. Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science* 1993; 259: 1865-6.
40. Zhang F, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Ann Rev Biochem* 1996; 65: 241-69.
41. Flora L. Comparative antiinflammatory and bone protective effects of two bisphosphonates on rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 240-6.
42. Dunn CJ, Galinet LA, Wu H, Nugent RA, Schlachter ST, Strait ND, et al. Demonstration of novel anti-arthritis and anti-inflammatory effects of diphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 226: 1691-8.
43. Ceponis A, Waris A, Mönkönen J, Laasonen L, Hytinen M, Solovieva SA, et al. Effects of low-dose, non-cytotoxic, intraarticular liposomal clodronate on development of erosions and proteoglycan loss in established antigen-induced arthritis in rabbit. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1908-916.
44. Van Rooijen N, Sanders A, van den Berg TK. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidime. *J Immunol Methods* 1996; 193: 93-9.
45. Selander KS, Monkkonen J, Karhukorpi EK, Harkonen P, Hannuniemi R, Vaananen HK. Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 1127-38.

46. Makkonen N, Salmien A, Rogers MJ, Frith JC, Urtti A, Azhayeva E, et al. Contrasting effects of alendronate and clodronate on raw 264 macrophages: the role of a bisphosphonate metabolite. *Eur J Pharm Sci* 1999; 8: 109-18.
47. Monkkonen J, Health TD. The effects of liposome-encapsulated and free clodronate on the growth of macrophage-like cells in vitro: the role of calcium and iron. *Calcif Tissue Int* 1993; 53: 139-46.
48. Serretti R, Core P, Muti S, Salaffi F. Influence of dichloromethylene diphosphonate on reactive oxygen species production by human neutrophils. *Rheumatol Int* 1993; 13: 135-8.
49. van Lent PL, Holthuysen AE vRN, van de Putte LB, van der Berg WB. Role of macrophage-like synovial lining cells in localization and expression of inflammation in type II collagen-induced arthritis. *Scand J Rheumatol* 1995; 101(Suppl): 83-9.
50. Hamma-koutbali Y, Di Benedetto M, Ledoux D, Oudar O, Leroux Y, Lecouvey M, et al. A novel non-containing-nitrogen bisphosphonate inhibits both in vitro and in vivo angiogenesis. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; 24: 816-23.
51. Green JR, Clezardin P. Mechanisms of bisphosphonate effect on osteoclasts, tumor cell growth, and metastasis. *Am J Clin Oncol* 2002; 25(Suppl 1): S3-S9.
52. Heikkilä P, Teronen O, Hirn MY, Sorsa T, Tervahartia T, Salo T, et al. Inhibition of matrix-metalloproteinase-14 in osteosarcoma cells by clodronate. *J Surg Res* 2003; 1: 45-52.
53. Breedveld FC, Trentham DE. Progress in the understanding of inducible models of chronic arthritis. *Rheum Dis Clin* 1987; 13: 531-44.
54. Storm G, Crommelin DJA. Liposomes: quo vadis? *Pharm Sci Tech Today* 1998; 1: 115-24.
55. Osterman T, Kippo K, Lauren L, Pasanen I, Hannuniemi R, Sellman R. A comparison of clodronate and indomethacin in the treatment of adjuvant arthritis. *Inflamm Res* 1997; 46: 79-85.
56. Osterman T, Kippo K, Laurén L, Hannuniemi R, Sellman R. Effect of clodronate on established adjuvant arthritis. *Rheumatol Int* 1994; 14: 139-47.
57. Pennanen N, Lapinjoki S, Urtti A, Monkkonen J. Effect of liposomal and free bisphosphonates on the IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha secretion from RAW 264 cells in vitro. *Pharm Res* 1995; 12: 916-22.
58. Kong AS, Shao J, Rappo R, Leibowitz M. Effects of diphosphonates on rat adjuvant arthritis. *Int J Immunopharmacol* 1982; 4: 311.
59. Van Lent P, van den Berselaar L, van den Hoek A, van de Ende M, Dijkstra CD, Van Rooijen N. Reversible depletion of synovial lining cells after intra-articular treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Rheumatol Int* 1993; 13: 21-30.
60. Redlich K, Hayer S, Maier A. Tumor Necrosis factor  $\alpha$ -mediate joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with protegerin. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 785-92.
61. Markusse HM, Lafeber GJ, Breedveld FC. Bisphosphonate in collagen-induced arthritis. *Rheumatol Int* 1990; 9: 281-3.
62. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF- $\alpha$  and RANK-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 2003; 111: 821-31.
63. Cantatore FP, Acquista CA, Pipitone V. Evaluation of bone turnover and osteoclastic cytokines in early rheumatoid arthritis treated with alendronate. *J Rheumatol* 1999; 26: 2318-23.
64. Van Offel JF, Schuerwegh AJ, Bridts CH, Bracke PG, Stevens WJ, De Clerck LS. Influence of cyclic intravenous pamidronate on proinflammatory monocytic cytokine profiles and bone density in rheumatoid arthritis treated with low dose prednisolone and methotrexate. *Clin Exp Rheum* 2001; 19: 13-20.
65. Eggelmeier F, Papapoulos SE, Henk C, et al. Clinical and biochemical response to single infusion of pamidronate in patients with active rheumatoid arthritis: a double blind placebo controlled study. *J Rheumatol* 1994; 21: 2016-20.
66. Maccagno A, Di Giorgio E, Roldan EJA, Caballero LE, Perez Lloret A. Double blind radiological assessment of continuous oral pamidronate acid in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994; 23: 211-4.
67. Ralston SH, Hacking L, Willocks L, Bruce F, Pitkeathly DA. Clinical, biochemical and radiographic effects of aminohydroxypropylidene bisphosphonate treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 396-9.
68. Maksymowych WP, Jhangri GS, Leclercq S, Skeith K, Yan A, Russel AS. An open study of pamidronate in the treatment of refractory ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1998; 25: 714-7.
69. Maksymowych WP, Jhangri GS, Fitzgerald AA, Leclercq S, Chiu P, Yah A, et al. A six-month randomized, controlled, double-blind, dose-response comparison of intravenous pamidronate (60 mg versus 10 mg) in the treatment of nonsteroidal antiinflammatory drug-refractory ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 766-73.
70. Maksymowych WP, Lambert R, Jhangri GS, Leclercq S, Chiu P, Wong B, et al. Clinical and radiological amelioration of refractory peripheral spondyloarthritis by pulse intravenous pamidronate therapy. *J Rheumatol* 2001; 28: 144-55.
71. Ferraccioli GF, Salaffi F, Carotti M, Cervini C, Baroli E. C12 MDP improves rheumatoid inflammation. In: 5th INWIN, Interscience World Conference of Inflammation, Antirheumatics, Analgesics, Immunomodulators, Geneva, Switzerland 1993; 25-28 April 1993: abstract 208.
72. Cantatore FP, Ingrosso AM, Carozzo M. Effects of bisphosphonates on interleukin-1, tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\beta$  microglobulin in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 23: 1117-8.
73. Barrera P, Blom A, van Lent PLEM, van Bloois L, Beijnen JH, Van Rooijen N, et al. Synovial macrophage depletion with clodronate-containing liposomes in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29: 1117-8.

- matoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1951-9.
74. van Lent PL, Holthuysen AE, van den Bersselaar LA, van Rooijen N, Joosten LA, van de Loo FA, et al. Phagocytic lining cells determine local expression of inflammation in type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1545-55.
  75. Thiebaud D, Sauty A, Burkhardt P, Leuenberger P, Sitzer L, Green JR, et al. An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 1997; 61: 386-92.
  76. Harinck HI, Papapoulos SE, Blanksma HJ, Vermey P, Bijvoet OL II. Paget's disease of bone: early and late responses to three different with aminohydroxypropylidene bisphosphonate (APD). *BMJ* 1987; 295: 1301-5.
  77. Wuster C, Schoter KH, Thiebaud D, Manegold C, Krahl D, Clemens MR, et al. Methylpentylaminopropylidene-bisphosphonate (BM 21.0955): a new potent and safe bisphosphonate for the treatment of cancer-associated hypercalcemia. *Bone Miner* 1993; 22: 77-85.
  78. Gallacher SJ, Ralston SH, Patel U, Boyle IT. Side-effects of pamidronate. *Lancet* 1989; ii: 42-3.
  79. Fenton AJ, Gutteridge DH, Kent GN, Price RI, Rettalack RW. Intravenous aminobisphosphonate in Paget's disease: clinical, biochemical, histomorphometric and radiological responses. *Clin Endocrinol* 1991; 34: 197-204.
  80. Schweitzer DH, Oostendorp-van de Ruit M, van der Pluijm G, Löwik CWGM, Papapoulos SE. Interleukin-6 and the acute-phase response during treatment of patients with Paget's disease with the nitrogen-containing bisphosphonate dimethylaminohydroxypropylidene bisphosphonate. *J bone Min Res* 1995; 10: 956-62.
  81. Sauty A, Pecherstorfer M, Zimmer-Roth I, Fioroni P, Juillerat L, Markert M, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy. *Bone* 1996; 18: 133-9.
  82. Adami S, Bhalla AK, Dorizzi R, Montesanti F, Rosini F, Salvagno G, et al. The acute-phase response after bisphosphonate administration. *Calcif Tissue Int* 1987; 41: 326-31.
  83. Cantrill JA, Andersn DC. Treatment of Paget's disease of bone. *Clin Endocrinol* 1990; 32: 507-18.
  84. Pioli G, Hughes DE, Milan A, Aarden L, Meager A, Chapman K, et al. Bisphosphonate stimulate the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Calcif Tissue Int* 1990; 46 (suppl 2): A54.
  85. Bijvoet OLM, Frijlink WB, Mulder H, van Osteroom AT. APD in Paget's disease of bone. Role of the mononuclear phagocyte system. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 1193-204.
  86. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordoni R, George S, et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. *N Engl J Med* 1996; 334: 488-93.
  87. Endo Y, Nakamura M, Kikuchi T, Shinoda H, Takeda Y, Nitta Y, et al. Aminoalkylbisphosphonates, potent inhibitors of bone resorption, induce a prolonged stimulation of histamine synthesis and increase macrophages, granulocytes and osteoclasts in vivo. *Calcif Tissue Int* 1993; 52: 248-54.
  88. Pietschmann P, Stohlawetz P, Brosch S, Steiner G, Smolen JS, Peterlik M. The effect of alendronate on cytokine production, adhesion molecule expression, and transendothelial migration of human peripheral blood mononuclear cells. *Calcif Tissue Int* 1998; 63: 325-30.
  89. Muehleman C, Green J, Williams JM, Kuettner KE, Thonar EJ, Sumner DR. The effect of bone remodeling inhibition by zoledronic acid in an animal model of cartilage matrix damage. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 226-33.
  90. Podworny NV, Kandel RA, Renlund RC, Grynblas MD. Partial chondroprotective effect of Zolendronate in a rabbit model of inflammatory arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26:1972-82.
  91. Evans CH, Mears DC. Binding of the bone-seeking agent <sup>99m</sup>Tc-1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid to cartilage and collagen in vitro and its stimulation by Er<sup>3+</sup> and low pH. *Calcif Tissue Int* 1980; 32: 91-4.
  92. Evequoz V, Trechsel U, Fleish H. Effect of bisphosphonates on production of interleukin 1-like activity by macrophages and its effect on rabbit chondrocytes. *Bone* 1985; 6: 439-44.
  93. Guenther HL, Guenther HE, Fleisch H. The effects of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate and dichloro-methane-diphosphonate on collagen synthesis by rabbit articular chondrocytes and rat bone cells. *Biochem J* 1981; 196: 293-301.
  94. Edmonds-Alt X, Brelriere JC, Roncucci R. Effects of 1-hydroxyethylene-1,1-diphosphonate and (chloro-4-phenyl)-thiomethylene bisphosphonic acid (SR 41319) on the mononuclear cell factor-mediated release of neutral proteinases by articular chondrocytes and synovial cells. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 4043-9.