Μηχανισμοί δράσης των διφωσφονικών αλάτων: νεότερα δεδομένα

Ευσταθία ΤΣΕΤΣΕΝΕΚΟΥ[1], Δήμος ΚΑΛΥΒΑΣ[2]

Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών (Διευθυντής: Καθηγητής Κ. Αλεξανδρίδης)

New insights into the mechanisms of bisphosphonates action

Efstathia TSETSENEKOU, Dimos KALYVAS

Oral & Maxillofacial Surgery Clinic. Dental School, University of Athens (Head: Professor C. Alexandridis)

Βιβλιογραφική ανασκόπηση
Literature Review

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Τα διφωσφονικά άλατα σήμερα έχουν καθιερωθεί στη θεραπεία και πρόληψη σκελετικών επιπλοκών που σχετίζονται με ασθένειες όπου λαμβάνει χώρα οστεοκλαστική δραστηριότητα, όπως το πολλαπλό μυέλωμα, καρκίνοι διαφόρων οργάνων με οστικές μεταστάσεις, νόσος Paget, ενώ χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Στις μέρες μας ερευνάται η χρήση τους και ως επαγωγέων της οστεοενσωμάτωσης οδοντικών εμφυτευμάτων, ενώ η εφαρμογή τους στις αρθροπλαστικές για τη βελτίωση της μακροπρόθεσμης επιτυχίας τους είναι ελπιδοφόρα. Τα δεδομένα ωστόσο για τους μηχανισμούς δράσης τους συνεχίζουν να εμπλουτίζονται ή και να αναθεωρούνται.
Κάθε ένα από τα διφωσφονικά άλατα διαθέτει μοναδικό προφίλ ως προς την ικανότητα σύνδεσης με το ανόργανο μέρος του οστού και τις ενδοκυττάριες βιοχημικές του δράσεις. Δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμα η υπόθεση ότι οι φαρμακολογικές διαφορές τους σχετίζονται με τις κλινικές αποδόσεις τους. Η κυρίαρχη διαφορά ανάμεσα στα διφωσφονικά άλατα φαίνεται πως είναι οι βιοχημικοί τους στόχοι.
Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η βιβλιογραφική αναφορά των τελευταίων εξελίξεων που αφορούν στη γνώση των μηχανισμών δράσης των διφωσφονικών αλάτων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Διφωσφονικά άλατα, οστεοκλαστική δραστηριότητα, οστεοπόρωση

[1] *Οδοντίατρος, MSc Παθοβιολογίας Στόματος*
[2] *Επίκ. Καθηγητής ΣΓΠΧ ΕΚΠΑ*

Παρελήφθη: 30/10/2010 - Έγινε δεκτή: 2/03/2010

SUMMARY: Bisphosphonates are nowadays the most common class of drugs used to prevent and treat skeletal disorders related to diseases resulting from increased osteoclastic activity, such as multiple myeloma, metastatic cancer, Paget's disease, as well as for management of osteoporosis. The use of bisphosphonates as promoters of osseointegration for dental implants is currently being investigated. Their application in joint arthroplasty for optimizing long-term success has also produced promising results. However, the knowledge of their mechanisms of action is constantly being enriched or modified.
Each bisphosphonate has its own unique profile regarding its binding affinity with bone mineral and intracellular biochemical activities. The supposed relation between their pharmacological differences and clinical effectiveness has not yet been confirmed. It appears that the major difference between bisphosphonates arises from their biochemical targets (after their cellular uptake).
The aim of this study is to report new insights into the mechanisms of action of bisphosphonates.

KEY WORDS: Bisphosphonates, osteoclastic activity, osteoporosis

Paper received: 30/10/2010 - Accepted: 2/03/2010

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη δεκαετία του '60 ο Fleisch και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν ότι στο πλάσμα και τα ούρα περιέχονται συστατικά που εμποδίζουν τη δημιουργία ιζήματος φωσφορικού ασβεστίου και ότι μέρος της δράσης αυτής οφείλεται στο πυροφωσφορικό οξύ (PPi). Το ανόργανο άλας του πυροφωσφορικού οξέος που παρουσιάζει μεγάλη χημική ομοιότητα με τους κρυστάλλους ασβεστίου, εμποδίζει το σχηματισμό και τη διάλυσή τους in vitro και καθώς και την ασβεστοποίηση (εφαλάτωση) in vivo (Russell και συν. 1970). Παρ' όλα αυτά, το ανόργανο άλας αποδείχθηκε αδρανές, όταν χορηγήθηκε από το στόμα, εξαιτίας του ταχέος μεταβολισμού του στο σώμα. Το στοιχείο αυτό οδήγησε την έρευνα στην παραγωγή σταθερών αναλόγων του PPi με την ίδια φυσικοχημική δράση, αλλά με την ικανότητα αντίστασης στην υδρόλυση (Εικ. 1).

Τα διφοσφωνικά εξαιτίας της μεγάλης ομοιότητας τους με το ανόργανο οστό (μέσω της δημιουργίας συμπλεγμάτων με τα ιόντα ασβεστίου) χρησιμοποιήθηκαν εξαρχής ως παράγοντες ανίχνευσης των οστών, με τη μέθοδο των ραδιοϊσοτόπων, προκειμένου να ανευρίσκονται οστικές μεταστάσεις και άλλες σκελετικές βλάβες (Bisaz και συν. 1978). Στη δεκαετία του '70 άρχισαν να χρησιμοποιούνται θεραπευτικά στην ογκολογία. Σήμερα έχουν πλέον καθιερωθεί στη θεραπεία και πρόληψη σκελετικών επιπλοκών σε ασθένειες όπου λαμβάνει χώρα αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα, όπως το πολλαπλό μυέλωμα, καρκίνοι διαφόρων οργάνων με οστικές μεταστάσεις, νόσος Paget και στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Στην εμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση τα διφωσφονικά μειώνουν τους δείκτες ελάττωσης της οστικής μάζας και τον κίνδυνο σπονδυλικών και μη καταγμάτων και αυξάνουν την πυκνότητα του ανόργανου οστού στο οσφυϊκό τμήμα της σπονδυλικής στήλης και το ισχίο (Watts και συν. 1990, Liberman και συν. 1995, Reginster και συν. 2000). Τα διφωσφονικά χρησιμοποιούνται ακόμη για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης από γλυκοκορτικοειδή, στην ανδρική οστεοπόρωση και στην ατελή οστεογενεσία που εμφανίζεται στην παιδική ηλικία.

Η ετιδρονάτη, το αρχαιότερο μέλος της ομάδας των διφωσφονικών αλάτων, συντέθηκε από Γερμανούς χημικούς τον 19ο αιώνα και εγκρίθηκε από τον FDA το 1977, ενώ η αλεδρονάτη εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης το 1995. Μαζί με την ρισεδρονάτη, την ιμπανδρονάτη και τελευταία την ζολεδρονάτη εγκρίθηκαν και χρησιμοποιούνται σε πολλές χώρες. Επίσης διάφορα άλλα διφωσφονικά μελετώνται ακόμα ή χρησιμοποιούνται σε κάποιες χώρες. Τα δεδομένα ωστόσο για τους μηχανισμούς δράσης τους συνεχίζουν να εμπλουτίζονται ή και να αναθεωρούνται.

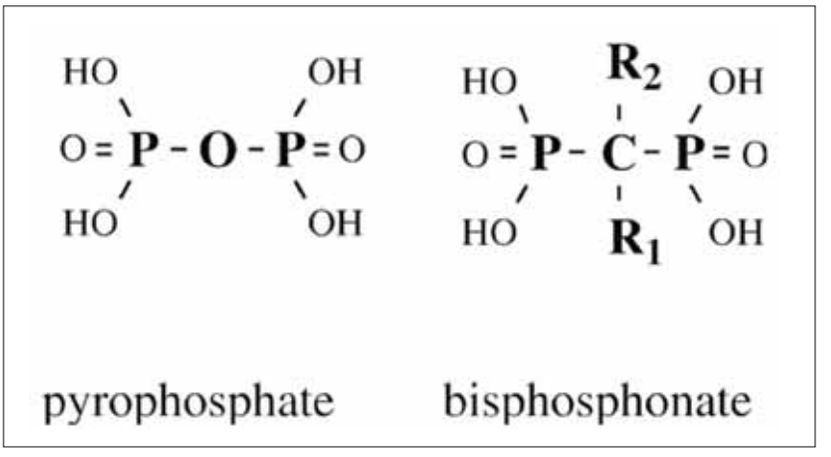
Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η παρουσίαση των

INTRODUCTION

In the 1960s, Fleish and his collaborators discovered that blood plasma and urine contain substances preventing the production of calcium phosphate sediment, and that this activity is due in part to the presence of pyrophosphoric acid (PPi). The inorganic salt of pyrophosphoric acid bears a strong chemical resemblance to calcium crystals and inhibits their formation and dissolution in vitro, as well as the calcification (mineralization) in vivo (Russell et al. 1970). However, when administered orally, this inorganic salt was proved to be inactive, because of its rapid metabolism in the body. This gave rise to further research aiming to producing stable analogues of PPi, displaying the same physicochemical action, but a higher resistance in hydrolysis (Fig. 1).

Because of their strong reseblance to bone mineral (through the formation of compounds with calcium ions), BPs have been initially used as bone imaging agents, by means of radioisotopes, in order to detect bone metastases and other skeletal disorders (Bisaz et al. 1978). In the 1970s BPs started to be used for therapeutic reasons in oncology. Nowadays, they are used widely to treat and prevent skeletal disorders related to diseases resulting from increased osteoclastic activity, such as multiple myeloma, osseous metastases of various cancer types, Paget's disease, as well as to treat osteoporosis. In postmenopausal osteoporosis, bisphosphonates decrease the bone turnover markers, increase bone mineral density (BMD) in the lumbar segment of the vertebral column and the ischium, while decreasing the risk of fractures in vertebrae or elsewhere (Watts et al. 1990, Liberman et al. 1995, Reginster et al. 2000). Bisphosphonates are also used to treat osteoporosis caused by glucocorticoids, male osteoporosis and osteogenesis imperfecta in children.

Etidronate, the "oldest member" of bisphosphonates



Εικ. 1: Τα διφωσφονικά είναι σταθερά ανάλογα του πυροφωσφορικού οξέος.
Fig. 1: Bisphosphonates are stable analogues of pyrosphophoric acid

τελευταίων εξελίξεων που αφορούν στη γνώση των μηχανισμών δράσης των διφωσφονικών αλάτων, όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ

Τα διφωσφονικά άλατα αποτελούνται από δύο φωσφονικές ομάδες ενωμένες με φωσφοαιθερικούς δεσμούς σε κεντρικό άνθρακα (P-C-P δομή) (Εικ. 1). Οι δύο φωσφονικές ομάδες είναι απαραίτητες τόσο για τη σύνδεση με το ανόργανο μέρος του οστίτη ιστού, όσο και για την αντιαπορροφητική δράση με κυτταρική διαμεσολάβηση. Μετατροπές σε μία από τις δύο ομάδες μπορεί να μειώσουν δραματικά την ικανότητα σύνδεσης των διφωσφονικών αλάτων (BPs) με το ανόργανο τμήμα του οστού και τη βιοδιαθεσιμότητά τους (Ebetino και συν. 1998). Οι άλλες δύο θέσεις του ατόμου του άνθρακα είναι δυνατό να συνδεθούν ομοιοπολικά με άλλο άτομο άνθρακα ή οξυγόνου ή αλογόνου ή θείου ή αζώτου, οδηγώντας σε έναν τεράστιο αριθμό πιθανών ενώσεων. Αυτές οι δύο ομάδες (πλάγιες αλυσίδες), αναφέρονται συνήθως ως R1 και R2 και είναι υπεύθυνες για το μεγάλο φάσμα δράσεων ανάμεσα στα διάφορα διφωσφονικά.

Επίδραση στον υδροξυαπατίτη και στο ανόργανο μέρος του οστού

Είναι γνωστό ότι τα BPs επιδρούν πολλαπλά στον υδροξυλαπατίτη (HAP) με τους παρακάτω τρόπους: 1) εμποδίζουν την de novo καθίζηση φωσφορικού ασβεστίου του διαλύματος, 2) καθυστερούν τον μετασχηματισμό του άμορφου HAP σε κρυσταλλικό, 3) εμποδίζουν τη συσσωμάτωση και τη διάλυση των κρυστάλλων (Russell et al. 2008).

Η ικανότητα σύνδεσης οποιουδήποτε BP με τον HAP καθορίζει σε σημαντικό βαθμό το πως και το που αυτό θα συνδεθεί με το οστό καθώς και τη διάρκεια της σύνδεσής του. Οι Nancollas και συν. (2006) ταξινόμησαν σε λίστα την ικανότητα σύνδεσης των διφοσφωνικών από την άποψη της κινητικής, ως εξής: χλωδρονάτη < ετιδρονάτη < ρισενδρονάτη < ιμπανδρονάτη < αλενδρονάτη < παμιδρονάτη < ζολενδρονάτη. Προκειμένου να προσομοιαστεί η συμπεριφορά των BPs επάνω στις οστικές επιφάνειες, χρησιμοποιήθηκε επίσης μία πρωτότυπη μέθοδος χρωματογραφίας του HAP (Lawson και συν. 2005), που έδειξε ότι τα διφωσφονικά διαχωρίζονται με παρόμοιο, αλλά όχι ίδιο τρόπο σύνδεσης, με αυτόν που δείχνει η σειρά των Nancollas και συν. (2006). Γενικά μερικές από τις πιο σημαντικές σχέσεις δομής-δράσης που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση διφωσφονικών και υδροξυλαπατίτη και έχουν εδραιωθεί επιστημονικά (Russell et al. 2007) είναι οι παρακάτω:

(BPs), was composed by German chemists in the 19th century and was approved by the FDA in 1977. Aledronate was approved by the FDA for the treatment of osteoporosis in 1995. Together with risedronate, ibandronate and, finaly, zoledronate they were approved and are now used in several countries. However, our knowledge of their mechanisms of action is constantly being enriched or modified.

The aim of this paper is to provide the latest insights into the mechanisms of action of bisphosphonates, as reported in the relevant literature.

CHEMICAL PROPERTIES OF BISPHOSPHONATES

Bisphosphonates consist of two phosphonate groups linked to a central carbon atom by phosphodiesteric bonds (P-C-P stucture) (Fig. 1). The two phosphonate groups are essential both for binding to the inorganic part of the osseous tissue and for cell-mediated antiresorptive activity. Modifications to one or both groups can dramatically reduce the affinity of BPs to the inorganic part of the bone and their bioavailability (Ebetino et al. 1998). The other two positions of the carbon atom can be covalently bound to another carbon atom or to oxygen, halogen, sulphur or nitrogen atoms, leading to a vast number of possible compounds. These two groups (side chains) are usually referred to as R1 and R2, and account for a wide range of possible actions among various bisphosphonates.

Actions in hydroxylapatite (HAP) and bone mineral

It is known that BPs have multiple effects on hydroxyapatite (HAP): 1) they inhibit the de novo precipitation of the diluted calcium phosphate, 2) retard the transformation of amorphous HAP to crystalline, 3) inhibit the aggregation and the dissolution of crystals (Russell et al. 2008).

The binding affinity of any BP to HAP determines, to a large extent, how and where the BP will bind to the bone, as well as how long this bond will last. Nancollas et al. (2006) established a rank order of binding affinity in terms of kinetics as follows: clodronate < etidronate < risedronate < ibandronate < alendronate < pamidronate < zoledronate. In order to simulate the behaviour of BPs on bone surfaces, a novel method of HAP chromatography was used (Lawson et al. 2005), which showed that bisphosphonates separate in a similar but not identical order to the one indicated by Nancollas et al. (2006). In general, the scientifically proved relation between structure–action association and the interaction amongst bisphosphonates and hydroxyapatite is valid for the following (Russell et al. 2007):

1. Η δομή O-P-C-P-O είναι σημαντική
2. Η ύπαρξη υδροξυλομάδας αντί υδρογονομάδας στη θέση της πλάγιας ομάδας R1 ενισχύει τη σύνδεση του BP με τον HAP
3. Ένα άτομο αζώτου και η τοποθέτησή του σε αλκυλομάδα ή σε ετεροκυκλικό δακτύλιο στην πλάγια ομάδα R2 μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της σύνδεσης του BP με τον HAP
4. Τη σύνδεση ενισχύει και η αμινομάδα ανάμεσα στη δομή P-C-P και την υπόλοιπη πλάγια ομάδα R2
5. Οι μικρές αλλαγές στη χημική δομή των διφωσφονικών οδηγούν όπως φαίνεται σε σημαντικές αλλαγές της τρισδιάστατης μορφής και του ατομικού προσανατολισμού. Γι'αυτό θεωρήθηκε ότι η τρισδιάστατη μορφή των αμινοδιφωσφονικών (N-BPs) και ο προσανατολισμός των ατόμων αζώτου (των πλαγίων ομάδων R2), τα οποία καθιστούν δυνατό το σχηματισμό των N-H-O δεσμών στις επιφάνειες των κρυστάλλων, επηρεάζουν σημαντικά τη σύνδεση με το ανόργανο οστό. Οι διαφορές υποστηρίζονται και από μελέτες διερεύνησης των γωνιών και αποστάσεων ανάμεσα στους N-H-O δεσμούς (Deutsch και συν. 1980, Ebetino και συν. 2005, Lawson και συν. 2005). Για την καλή σύνδεση με την επιφάνεια του HAP θα πρέπει η γωνία N-H-O να είναι μεγαλύτερη ή ίση των 125° και η απόσταση N-O περίπου 3Å.
6. Αυξάνοντας την ποσότητα των BPs σε ένα διάλυμα κρυστάλλων HAP, η ποσότητα εκείνη που συνδέεται με τους κρυστάλλους εξαρτάται από τη χημική τους συγγένεια (που έχει κάθε διφωσφονικό με τον υδροξυλαπατίτη). Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των BPs ως προς τα ποσά που μπορούν να συνδεθούν στο σημείο κορεσμού, ωστόσο, ανεξαρτήτως της χημικής συγγένειας, όλο και μεγαλύτερο μέρος των διφωσφονικών του διαλύματος συνδέεται με τον υδροξυλαπατίτη έως ένα σημείο κορεσμού, που αντανακλά την ικανότητα των κρυστάλλων να προσροφούν το δεδομένο διφωσφονικό στην επιφάνειά τους. Σύμφωνα με μελέτες ισοθερμικών καμπυλών προσρόφησης (Ebrahimpour και συν. 1995) η ικανότητα σύνδεσης σε pH 7.4 ακολουθεί την παρακάτω σειρά: ρισεδρονάτη< ζολεδρονάτη< ιμπανδρονάτη< ετιδρονάτη< αλεδρονάτη.
7. Τα διφωσφονικά παρουσιάζουν διαφορές στα ηλεκτρικά φορτία στο άτομο του αζώτου της R2 πλάγιας ομάδας σε pH 7.4, που οδηγεί σε διαφορές του μοριακού φορτίου (zeta potential) όταν συνδέονται με τον υδροξυλαπατίτη. Αυτό μπορεί να επηρεάσει πολλαπλές διεργασίες, όπως: την επιπλέον σύνδεση φορτισμένων μορίων, το συνολικό ποσό των διφωσφονικών που μπορούν να συνδεθούν στην επιφάνεια του οστίτη ιστού (loading capacity), την κυτταρική και σκελετική διανομή τους, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα ιόντα και συστατικά της θεμέλιας ουσίας, όπως η οστεοκαλσίνη, οστεονεκτί-

1. The O-P-C-P-O structure is important
2. A hydroxyl group instead of a hydrogen group at the R1 site enhances BP binding to HAP
3. A nitrogen atom and its position in the alkyl group or heterocyclic ring in the R2 side chain can lead to significant increases in BP binding to HAP
4. An amine group between the P-C-P structure and the rest of the R2 side group can also enhance binding
5. Slight changes in the chemical structure of BPs appear to lead to significant changes in the 3D configuration and atom orientation. Therefore, it was concluded that the 3D configuration of aminobisphosphonates (N-BPs) and the orientation of their R2 nitrogen atoms that enable N-H-O bonds to form on the crystal surfaces, have a significant effect on binging affinity to bone mineral. These differences are also confirmed by studies based on N-H-O bond angles and distances (Deutsch et al. 1980, Ebetino et al. 2005, Lawson et al. 2005). To obtain optimal binding to the HAP surface, the N-H-O angle should be ≥125° and the N-O distance approximately 3Å.
6. By increasing the amount of BPs in a solution of HAP crystals, the amount bound to the crystals will depend on their chemical affinity (of each bisphosphonate to hydroxyapatite). There are differences among the various BPs regarding the amounts that can be bound at saturation point. However, regardless of their chemical affinity, a growing amount of the solution's BPs will be bound to hydroxyapatite reaching up to a saturation level that reflects the capacity of crystals to adsorb a given number/ portion of BPs onto their surface. Based on facts obtained from absorption isotherms (Ebrahimpour et al. 1988), the binding capacity appears to lie in the following order at pH 7.4: risedronate < zoledronate < ibandronate < etidronate < alendronate.
7. BPs exhibit different electrical charges on their nitrogen atom in the R2 side group at pH 7.4, which leads to differences in zeta potential when they bind to HAP surfaces. This might have multiple consequences, for instance, on the further binding of charged molecules, the total amount of BPs that can bind onto the bone surface (loading capacity), their cellular and skeletal distribution, as well as their interactions with charged ions and matrix constituents such as osteocalcin, osteonectin, bone sialoproteins and proteoglycans. Zeta potential might influence the amount of bisphosphonates bound on HAP, as revealed by absorption isotherms. One explanation for these findings is that more positively charged BPs (alendronate, ibandronate, and zoledronate) create a more positively charged bone surface, which can attract additional BPs through their negatively charged phosphonate groups. This may further

νη, σιελοπρωτεΐνες του οστού και πρωτεογλυκάνες. Το μοριακό φορτίο ενδεχομένως να επηρεάζει την ποσότητα του διφωσφονικού που συνδέεται στον HAP, όπως αποκαλύπτεται από τη μελέτη των ισοθερμικών καμπυλών. Μία εξήγηση είναι ότι τα περισσότερο θετικά φορτισμένα BPs (αλενδρονάτη, ιμπανδρονάτη, ζολενδρονάτη) δημιουργούν μια θετικότερα φορτισμένη οστική επιφάνεια που μπορεί να έλκει επιπλέον διφωσφονικά μέσω των αρνητικά φορτισμένων φωσφονικών ομάδων τους. Αυτό αυξάνει και τη συσσώρευση των διφωσφονικών και βελτιώνει την ικανότητα μέγιστης σύνδεσης στους κρυστάλλους HAP. Τα διφωσφονικά που είναι λιγότερο φορτισμένα θετικά (π.χ. ρισενδρονάτη) οδηγούν στα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα. Το μοριακό φορτίο επομένως αποτελεί όπως φαίνεται μία ανεξάρτητη ιδιότητα που δεν συνδέεται άμεσα με τη χημική συγγένεια, αλλά επηρεάζει την ικανότητα σύνδεσης των διφωσφονικών.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

1. Η στόχευση των διφωσφονικών στα οστά και η ενδοκυττάρωση

Εξαιτίας της μεγάλης τάσης σύνδεσης των διφωσφονικών με το ανόργανο τμήμα του οστού, το φάρμακο απομακρύνεται ταχέως από την κυκλοφορία και συσσωρεύεται στις οστικές επιφάνειες. Σε μελέτες με ραδιοσημασμένα φάρμακα φαίνεται ότι τα διφωσφονικά απορροφώνται σε περιοχές οστικού σχηματισμού, ωστόσο προτιμούν τις περιοχές οστικής απορρόφησης (Masarachia και συν. 1996). Πολύ λίγες πληροφορίες υπάρχουν σχετικά με την in vivo διανομή των διφωσφονικών σε μικροανατομικό επίπεδο και για την ποσοτική διαφοροποίηση των διφωσφονικών μεταξύ των διαφόρων τύπων οστίτη ιστού, π.χ. δοκιδώδες / συμπαγές.

Στη διάρκεια της οστικής απορρόφησης ο υποκυτταρικός χώρος των οστεοκλαστών οξύνεται και σε αυτό το περιβάλλον τα διφωσφονικά απελευθερώνονται από τις οστικές επιφάνειες, αυξάνοντας τοπικά τη συγκέντρωσή τους, ως έχουν ή ως άλατα ασβεστίου (Suda και συν. 1997). Με μια διαδικασία, παρόμοια της ενδοκύττωσης, τα διφωσφονικά εισέρχονται στους οστεοκλάστες.

Υποστηρίζεται από διάφορους μελετητές ότι η απελευθέρωση των BPs από το οστό, λόγω της οστικής απορρόφησης από τους οστεοκλάστες, αποτελεί προϋπόθεση για την ενδοκυττάρωσή τους, επιλεκτικά από τους οστεοκλάστες και την αναστολή της οστεοκλαστικής δραστηριότητας (Selander και συν. 1994, Murakami και συν. 1995). Στην περίπτωση δε που ανασταλεί η οστεοκλαστική απορρόφηση με τη χρήση καλσιτονίνης, οι οστεοκλάστες προστατεύονται από τη δράση των παγιδευμένων διφωσφονικών στο οστό (Marshall και συν.

increase the accumulation of bisphosphonates and improve the maximum binding capacity on HAP crystals. Less positively charged bisphosphonates (e.g. risedronate) produce exactly the opposite effects. Therefore, zeta potential appears to be an independent property that is not directly related to chemical affinity, but affects the binding capacity of BPs.

CELLULAR AND MOLECULAR ACTIONS

1. Targeting of bisphosphonates in bones and endocytosis

Because of the high affinity of BPs to bone mineral, the drug is rapidly cleared from circulation and accumulates on bone surfaces. Studies involving radiolabeled drugs revealed that bisphosphonates are absorbed at sites of active formation, however they show a preference for sites of bone resorption (Masarachia et al. 1996). Only limited information is available on the proliferation of bisphosphonates in vivo at the microanatomical level and the quantitative differentiation of bisphosphonates among the different types of bone tissue, eg. trabecular / compact.

During bone resorption, the subcellular space of osteoclasts becomes acidic and, in such an environment, BPs are released from bone surfaces, thereby increasing their local concentration, either as they are or in the form of calcium salts (Suda et al. 1997). Through a process similar to endocytosis, BPs are taken up in osteoclasts. Many authors believe that the release of BPs from bone, due to bone resorption by osteoclasts, is a prerequisite for the selective internalize of BPs by osteoclasts and the suspension of osteoclastic activity (Selander et al. 1994, Murakami et al. 1995). In case osteoclastic resorption is inhibited with the use of calcitonin, osteoclasts are protected from the action of bisphosphonates that are deposited in the bone (Marshall et al. 1990). However Owens et al. (1997) noticed that BPs influenced osteoclasts, after the induction of a local decrease in pH, although the cells were not activated for resorption.

1990). Ωστόσο οι Owens και συν. (1997) παρατήρησαν ότι τα διφωσφονικά δύνανται να επιδράσουν στους οστεοκλάστες σε απουσία της απορροφητικής δραστηριότητάς τους, μετά την τεχνητή τοπική μείωση του pH που οδήγησε στην απελευθέρωσή τους από το οστό.

2. Ενδοκυττάριοι μηχανισμοί δράσης

α) Επίδραση στους οστεοκλάστες: Ο κυρίαρχος λόγος των διαφορών ανάμεσα στα BPs φαίνεται πως είναι οι βιοχημικοί τους στόχοι, μετά την ενδοκύττωσή τους από τους οστεοκλάστες. Υποστηρίζεται ότι τα BPs μπορεί να επηρεάσουν τη διαδικασία οστικής απορρόφησης μέσω των οστεοκλαστών ποικιλοτρόπως επιδρώντας τόσο στη στρατολόγηση, την διαφοροποίηση και την απορροφητική ικανότητα των οστεοκλαστών όσο και στη μορφολογία τους, προκαλώντας την απόπτωσή τους in vitro (Sato και συν. 1990).

Στη δεκαετία του 1990 τα διφοσφωνικά ταξινομήθηκαν αδρά σε δύο ομάδες:

I) Τα απλά διφωσφονικά όπως η χλωδρονάτη και η ετιδρονάτη, που μοιάζουν περισσότερο με το πυροφωσφορικό οξύ. Αυτά μεταβολίζονται ενδοκυττάρια σε β,γ μεθυλενικά ανάλογα της τριφωσφορικής αδενοσίνης (AppCp μεταβολίτες), με τη μεσολάβηση της αμινο-ακυλο tRNA συνθετάσης (αντίστροφη δράση του ενζύμου, το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες συμμετέχει στην ενεργοποίηση αμινοξέων κατά την πρωτεϊνοσύνθεση) (Frith και συν. 2001). Με αυτόν τον τρόπο η ομάδα P-C-P των διφωσφονικών αντικαθιστά την ομάδα P-O-P στην τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Οι μη υδρολυόμενοι μεταβολίτες συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα των οστεοκλαστών και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, πιθανώς εμποδίζοντας τη δράση ενζύμων που χρησιμοποιούν την ATP.

II) Τα δραστικότερα αμινοδιφωσφονικά (NBPs) που χαρακτηρίζονται από το άτομο αζώτου, είτε σε μια αλκυλομάδα είτε μέσα σε ετεροκυκλική δομή. Μέλη αυτής της ομάδας εμπλέκονται στην οδό βιοσύνθεσης της μεβαλονάτης (Luckman και συν. 1998), η οποία είναι γνωστή για το ρόλο της στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης και άλλων στερολών. Διάφορα ένζυμα αυτής της οδού χρησιμοποιούν ισοπρενοειδή διφωσφονικά ως υποστρώματα (IPP ισομεράση, FPPS, GGPP συνθετάση), επομένως τα διφωσφονικά θα μπορούσαν να δράσουν ως υποστρωματικά ανάλογα.

Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι κύριο στόχο των NBPs αποτελεί η FPPS (farnesyl pyrophosphate synthase), η οποία αναστέλλεται από το σύνολό τους σχεδόν (Fisher και συν. 1999). Το ένζυμο αυτό ανιχνεύεται τόσο στα υπεροξειδοσώματα όσο και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα, ενώ η θέση δράσης των διφωσφονικών δεν είναι ακόμα γνωστή. Η αναστολή του ενζύμου εμποδίζει τη σύνθεση της FPP (farnesyl pyrophosphate), που αποτελεί υπόστρωμα και για τη

2. Intracellular mechanisms of action

a) Effect on osteoclasts: It appears that the main reason for the differences among BPs is their biochemical targets, after their endocytosis by osteoclasts. It is claimed that BPs can influence via osteoclasts the process of bone resorption in different ways, thereby affecting the recruitment, differentiation and resorptive capacity of osteoclasts, as well as their morphology, resulting in their in vitro apoptosis (Sato et al. 1990).

In the 1990s, BPs were roughly classified into two groups:

I) Simple bisphosphonates such as clodronate and etidronate, which closely resemble to pyrophosphoric acid. They can be intracellularly metabolised into methylene-containing analogues of adenosine triphosphate (AppCp-type metabolites), by the mediation of aminoacyl tRNA synthetase (reverse reaction of the enzyme, which is normally involved in the activation of amino acids during protein synthesis (Frith et al. 2001). Thus, the P-C-P group of BPs replaces the P-O-P group in adenosine triphosphate (ATP). Non-hydrolysed metabolites are accumulated in the cytoplasm of osteoclasts and induce cellular death, probably by inhibiting the activity of enzymes using ATP.

II) More potent bisphosphonates, which contain a nitrogen atom either in an alkyl group or in an heterocyclic structure (NBPs). Members of this group are involved in the mevalonate biosynthetic pathway (Luckman et al. 1998), which is best known for its role in the biosynthesis of cholesterol and other sterols. Various enzymes of this pathway use isoprenoid bisphosphonates as a substrate (IPP isomerase, FPPS, GGPP synthase). Thus, bisphosphonates could act as substrate analogues.

It is now clear that FPPS (Farnesyl Pyrophosphate Synthase) is a major target for NBPs, and that it is inhibited by almost all of them (Fisher et al. 1999). This enzyme is identified both in peroxisomes and in mitochondria and cytoplasm, while the site of action of bisphosphonates is not yet known. Inhibition of this enzyme prevents the biosynthesis of FPP (Farnesyl Pyrophosphate), which is also the substrate for GGPP synthase (Geranyl-Geranyl Pyrophosphate synthase) to produce GGPP. Finally, cells are deprived of FPP and GGPP, which are necessary for the post-translational lipid modification of small GTPases, such as Ras, Rho and Rab (Dunford et al. 2006). These GTPases form a large group of signalling proteins that are essential for the survival and function of osteoclasts.

Inhibition of FPP synthase by NBPs also leads to the accumulation of IPP direct metabolite (Isopentenyl Diphosphate) in the biochemical pathway of mevalonate (for the biosynthesis of sterols). It appears that this accumulation of IPP causes the acute phase response, a well-recognized side effect of intravenous

συνθετάση της GGPP (geranyl-geranyl pyrophosphate synthase), προκειμένου να παραχθεί η GGPP. Τελικά τα κύτταρα στερούνται των FPP και GGPP που είναι μεταβολίτες απαραίτητοι για την μετα-μεταγραφική λιπιδική μετατροπή των μικρών GTPασών, όπως οι Ras, Rho και Rab (Dunford και συν. 2006). Οι GTP-άσες αυτές αποτελούν μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών-σινιάλων σημαντικών για την επιβίωση και λειτουργία των οστεοκλαστών.

Η αναστολή της FPP συνθετάσης από τα NBPs οδηγεί επίσης στη συσσώρευση του άμεσου μεταβολίτη IPP (isopentenyl diphosphate) στο βιοχημικό μονοπάτι της μεβαλονάτης (για τη βιοσύνθεση στερολών). Αυτή η συσσώρευση του IPP αποτελεί από ότι φαίνεται και την αιτία για την αντίδραση οξείας φάσης, μία γνωστή παρενέργεια των διφωσφονικών που χορηγούνται κυρίως ενδοφλέβια, και χαρακτηρίζεται από την παρουσία πυρετού και συμπτώματα γρίπης. Εξάλλου πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η συσσώρευση του IPP οδηγεί επίσης στην παραγωγή ενός νέου μεταβολίτη, του Apppl, από την ένωση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) με το IPP. Όπως ακριβώς ο μεταβολίτης τύπου AppCp (μεθυλενικά ανάλογα του ATP) των απλών διφωσφονικών, έτσι και ο Apppl, αναστέλλει το ένζυμο ANT των μιτοχονδρίων και μπορεί να προκαλέσει την απόπτωση των οστεοκλαστών (Monkkonen και συν. 2006).

Ένας ακόμα έμμεσος τρόπος δράσης των διφωσφονικών είναι η αναστολή της μεταβολικής δραστηριότητας των οστεοκλαστών, μέσω της αναστολής της αντλίας πρωτονίων-ATP. Με τον τρόπο αυτό αφενός αναστέλλεται η σύνθεση και η απελευθέρωση των υδρολυτικών ενζύμων και αφετέρου επηρεάζεται η ικανότητα αύξησης της οξύτητας στην εξωκυττάρια περιοχή δράσης των κυττάρων (David και συν. 1995).

β) Επίδραση στα οστεοκύτταρα: Τα BPs, σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει με τους οστεοκλάστες, αναστέλλουν την απόπτωση των οστεοκυττάρων. Η δράση αυτή καθίσταται δυνατή με τη διάνοιξη των διαύλων κονεξίνης 43 και την ακόλουθη ενεργοποίηση κάποιων ενδοκυττάριων κινασών που διεγείρονται από εξωκυττάρια ερεθίσματα (Plotkin και συν. 2006). Η υπόθεση ότι ο μηχανισμός δράσης των BPs στα οστεοκύτταρα είναι διαφορετικός από το μηχανισμό δράσης στους οστεοκλάστες, επαληθεύεται από το γεγονός ότι ακόμα και διφωσφονικά με ασθενέστερη αντιαπορροφητική δράση αυξάνουν την ικανότητα επιβίωσης των οστεοκυττάρων (Kogianni και συν. 2004, Plotkin και συν. 2007).

Τελευταία, η υπόθεση ότι τα BPs αποκτούν πρόσβαση στα οστεοκύτταρα ανάλογα με την ικανότητά τους να συνδέονται με το ανόργανο μέρος του οστού και κάποιες εγγενείς δομικές ιδιότητές τους κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος. Η υπόθεση αυτή βασίζεται και στο γεγονός ότι τα οστεοκύτταρα διαθέτουν ένα

BPs, involving fever and flu-like symptoms. Moreover, it has recently been discovered that the accumulation of IPP also leads to the production of a new metabolite called "Apppl", composed of adenosine monophosphate (AMP) and IPP. Just as the AppCp-type metabolite (methylene analogues of ATP) of simple bisphosphonates, Apppl inhibits the ANT enzyme of mitochondria and can induce the apoptosis of osteoclasts (Monkkonen et al. 2006).

Another indirect way in which BPs act, is the inhibition of the metabolic activity of osteoclasts, which is achieved by suspending the APT-proton pump, and inhibiting the synthesis and release of hydrolytic enzymes. Additionally the ability to increase extracellular acidity is affected (David et al. 1995).

b) Effect on osteocytes: In contrast to osteoclasts, BPs inhibit osteocyte apoptosis. This becomes possible by the opening of connexin 43 gap junction channels and the activation of certain intracellular kinases that are stimulated by extracellular factors (Plotkin et al. 2006). The hypothesis that the mechanism of action of BPs in osteocytes differs from the mechanism of action in osteoclasts is confirmed by the fact that even BPs with a lower antiresorptive activity can increase the survival of osteocytes (Kogianni et al. 2004, Plotkin et al. 2007). Lately, the hypothesis that BPs gain access to osteocytes according to their ability to bind to bone mineral, as well as to cetrain inherent structural properties that they have, has been contantly gaining ground. This hypothesis is also based on the fact that osteocytes have an extensive network of canaliculi, i.e. inorganic surfaces where bisphosphonates can be resorbed, with a total extent of about 1000-5000m^2! (Parfitt, 1976). Moreover, it is very likely that nutritional elements (and drugs) are transferred from the extracellular fluid to the inside of osteocytes through this vast superficial network of canaliculi.

Low concentrations of different BPs protect osteocytes and osteoblasts, in vitro and in animals, from apoptosis induced by glucocorticoids and mechanical strain (Plotkin et al. 1999, Follet et al. 2007).

c) Effect on osteoblasts: Most of the clinical effects on osteoblast function are attributed to indirect effects on the bone remodeling cycle through the reduction of bone resorption. Many years ago, a group of researchers reported that BPs inhibit osteoclast action indirectly by promoting the synthesis and release by osteoblasts of a low-molecular-weight factor (<10 kDa), which acts on progenitor cells, preventing them from generating mature osteoclasts (Vitte et al. 1996).

d) Effect on angiogenesis: The release of BPs from bone causes the concentration of the vascular endothelial growth factor (VEGF) circulating in the blood to drop (Ruggiero et al. 2004, Ferreti et al. 2005). VEGF does not only promote the development of endothelial cells,

μεγάλο δίκτυο σωληνίσκων, ανόργανες δηλαδή επιφάνειες όπου τα διφωσφονικά μπορεί να προσροφηθούν, με συνολική επιφάνεια που υπολογίζεται γύρω 1000-5000m^2! (Parfitt, 1976). Είναι δε πολύ πιθανή η μεταφορά τροφικών στοιχείων (και φαρμάκων) από το εξωκυττάριο υγρό στο εσωτερικό τους μέσω αυτού του τεράστιου επιφανειακού δικτύου σωληνίσκων.

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις διαφόρων BPs προστατεύουν οστεοκύτταρα και οστεοβλάστες in vitro και σε πειραματόζωα από την απόπτωση που οφείλεται σε γλυκοκορτικοειδή και μηχανικό φορτίο (Plotkin και συν. 1999, Follet και συν. 2007).

γ) Επίδραση στους οστεοβλάστες: Οι περισσότερες από τις κλινικές δράσεις στην οστεοβλαστική λειτουργία αποδίδονται σε έμμεσες δράσεις στον κύκλο οστικού μεταβολισμού, μέσω της μείωσης της οστικής απορρόφησης. Αρκετά χρόνια πριν αναφέρθηκε από ερευνητές ότι τα BPs αναστέλλουν έμμεσα την οστεοκλαστική δραστικότητα, προάγοντας τη σύνθεση και έκκριση ενός παράγοντα μικρού μοριακού βάρους (<10 kDa) από τους οστεοβλάστες, ο οποίος δρα στα προγονικά κύτταρα, εμποδίζοντάς τα να σχηματίσουν ώριμους οστεοκλάστες (Vitte και συν. 1996).

δ) Επίδραση στην αγγειογένεση: Η απελευθέρωση των διφωσφονικών από το οστό προκαλεί τη μείωση της συγκέντρωσης του κυκλοφορούντος στο αίμα αγγειακού αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου (Ruggiero και συν. 2004, Ferreti και συν. 2005). Ο παράγοντας VEGF (vascular endothelial growth factor) δεν προάγει μόνο την ανάπτυξη των κυττάρων του ενδοθηλίου, αλλά και την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και συνεπώς τη μεταφορά πρωτεϊνών και κυττάρων από την αιματική κυκλοφορία προς τους ιστούς (Ferrara και συν. 1992). Μελέτες έχουν δείξει ότι μέρος της αντινεοπλασματικής ικανότητας των BPs οφείλεται στην αναστολή της αγγειογένεσης. Οι Wood και συν. (2002) ήταν οι πρώτοι που έδειξαν πως τα διφωσφονικά με αμινο-τελικό άκρο, όπως το ζολεδρονικό οξύ, αναστέλλουν την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων ενώ οι Santini και συν. (2002) έδειξαν πως το παμιδρονικό οξύ μπορεί να αναστείλει τη σύνθεση του VEGF σε καρκινικούς ιστούς.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μετά την μεταφορά τους στις αντίστοιχες σκελετικές τους θέσεις όλα τα BPs εμποδίζουν την οστική απορρόφηση με ενδοκυτταρικές δράσεις στους οστεοκλάστες. Η ιστική και κυτταρική στοχοποίηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η οστική απορρόφηση αναστέλλεται με άμεση επίδραση των διφωσφονικών στους οστεοκλάστες ή σε άλλα οστικά κύτταρα του άμεσου μικροπεριβάλλοντος των οστεοκλαστών. Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι τα διφωσφονικά, ανάλογα με τη δομή και τη συγκέντρωσή τους στο μικροπεριβάλλον του οστού

but also increases blood vessel permeability and thus the transfer of proteins and cells from blood circulation to tissues (Ferrara et al. 1992). According to studies, part of the antineoplastic effect of BPs is attributed to the inhibition of angiogenesis. Wood et al. (2002) were the first to show that bisphosphonates with an amino-terminal end, such as zoledronic acid, inhibit the development of endothelial cells, while Santini et al. (2002) proved that pamidronic acid can prevent the synthesis of VEGF in cancer tissues.

CONCLUSIONS

After their delivery to the relevant skeletal sites, all BPs inhibit bone resorption through intracellular effects on osteoclasts. Tissue and cellular targeting leads to the conclusion that bone resorption is prevented through direct effects of bisphosphonates on osteoclasts or other bone cells in the immediate microenvironment of osteoclasts. It is worth mentioning here that BPs affect different types of bone depending on their structure and concentration in the bone microenvironment. For example low doses (<10-6) of pamidronate

επηρεάζουν διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους οστίτη ιστού. Για παράδειγμα η παμιδρονάτη ($C_3H_{11}NO_7P_2$ – β' γενιά) σε χαμηλές δόσεις ($<10^{-6}$) αναστέλλει την ενεργοποίηση, τη διαφοροποίηση και τη συνένωση των προγονικών κυττάρων των οστεοκλαστών, ενώ άλλα διφωσφονικά, όπως π.χ. η ετιδρονάτη, δεν προκαλούν τέτοιου είδους αναστολή (Boonekamp και συν. 1986). Σαφώς όμως όταν τα διφωσφονικά οποιασδήποτε δομής χορηγούνται σε μεγαλύτερες δόσεις ($>10^{6}$), αναστέλλουν την οστεοκλαστική δραστηριότητα των ώριμων οστεοκλαστών. Γενικά τα διφωσφονικά φαίνεται πως διαφοροποιούνται κυρίως ως προς τους βιοχημικούς τους στόχους, μετά την ενδοκύττωσή τους από τους οστεοκλάστες.

Πρόσφατες μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι παρόλο που τα διφωσφονικά μοιράζονται πολλές φαρμακολογικές ιδιότητες, κάθε ένα εξ αυτών διαθέτει μοναδικό προφίλ ως προς την ικανότητα σύνδεσης με το ανόργανο μέρος του οστού και τις ενδοκυττάριες βιοχημικές του δράσεις. Έχουν αυτές οι φαρμακολογικές διαφορές και πρακτική σημασία; Υπάρχουν πολλά προβλήματα στην προσπάθεια σύγκρισης των κλινικών αποτελεσμάτων των διαφόρων διφωσφονικών, εξαιτίας της έλλειψης κλινικών ερευνών όπου θα εξετάζεται ένα αποτέλεσμα κάθε φορά (π.χ. το κάταγμα). Μελετώντας ωστόσο τα δεδομένα που αναδύονται από τις ξεχωριστές κλινικές μελέτες ανά τον κόσμο, εκδηλώνονται προφανέστατα οι διαφορές ανάμεσα στα μέλη της ομάδας των διφωσφονικών ως προς α) την πρόληψη καταγμάτων, β) τις θέσεις όπου η πρόληψη αυτή είναι αποτελεσματική και γ) τη διάρκεια της επίδρασής τους. Είναι πάντως αναγκαίο να λάβουν χώρα πολλές ακόμα έρευνες προκειμένου να επιβεβαιωθεί η υπόθεση ότι οι φαρμακολογικές διαφορές σχετίζονται με τις κλινικές αποδόσεις των διφωσφονικών.

(C3H11NO7P2 –second generation) inhibit the activation, differentiation and fusion of osteoclast progenitor cells, while other BPs, such as etidronate, do not cause such an inhibition (Boonekamp et al. 1986). It is clear however that when bisphosphonates of any structure are administered at higher doses (>106), they inhibit the osteoclastic activity of mature osteoclasts. Generally, it appears that BPs are differentiated mainly in terms of their biochemical targets, after endocytosis by osteoclasts.

According to recent studies, although bisphosphonates share many pharmacological properties, each of them has a unique profile in terms of its capacity to bind to bone mineral and its intracellular biochemical activities. Do these pharmacological differences have a practical importance as well? There are many problems involved in attempting to compare the clinical results of different bisphosphonates. This is due to the lack of clinical trials examining one effect at a time (for instance, fractures). However, by reviewing data emerging from different clinical trials around the world, the differences among bisphosphonates become clear. These differences are related to: a) fracture prevention, b) the sites where prevention is effective, and c) the duration of their effects. Nevertheless, it is necessary to conduct many more research studies in order to confirm the hypothesis that the pharmacological differences of bisphosphonates are associated with their clinical effectiveness.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ/REFERENCES

Bisaz S, Jung A, Fleisch H: Uptake by bone of pyrophosphate, diphosphonates and their technetium derivatives. Clin Sci Mol Med 54: 265-268, 1978

Boonekamp PM, Van Der Wee-Pals LJA, Van Wijk –Van Lennep MLL et al: Two models of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. Bone Miner 1: 27-39, 1986

David P, Baron R: The vacuolar H1- ATPase: a potential target for drug development in bone diseases. Expert Opin Investig Drugs 4: 725-739, 1995

Deutsch E, Barnett BL: Synthetic and structural aspects of technetium chemistry as related to nuclear medicine. In: Inorganic chemistry in biology and medicine. American Chemistry Society, Washington, DC, 1980, pp 103-119

Dunford JE, Roger MJ, Edetino FH et al: Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac, Cdc42 and Rho GTPases. J Bone Miner Res 21:684-694, 2006

Ebetino FH, Francis MD, Rogers JM et al: Mechanisms of action of etidronate and other bisphosphonates. Rev Contemp Pharmacother 9: 233- 243, 1998

Ebetino FH, Barnet BL, Russel RGG: A computational model delineates differences in hydroxyapatite binding affinities of bisphosphonates[abstract]. J Bone Miner Res 20 [Suppl 1]:S259, 2005

Ebrahimpour A, Francis MD: Bisphosphonate therapy in acute and chronic bone loss Physical and chemical considerations in bisphosphonate- related therapies. In: OLM Bijvoet , HA Fleisch, RE Canfield, RGG Russell, eds Bisphosphonates on Bones. Amsterdam, Holland: Elsevier Science; 1995, pp.125-136

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth-factor family of proteins. Endocr Rev 13: 18-32, 1992

Ferretti G, Fabi A, Carlini P, Papaldo P, Cordiali Fei P, Di Cosimo S et al: Zoledronic-Acid-Induced Circulating Level Modifications of Angiogenic Factors, Metalloproteinases and Proinflammatory Cytokines in Metastatic Breast Cancer Patients. Oncology 69(1): 35-43, 2005

Fisher, J.E., M.J. Rogers, J.M. Halasy, et al: Alendronate mechanism of

action: genarylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. Proc Natl Acad Sci. USA 96: 133-138, 1999

Fleisch H, Russell RGG, Francis MD: Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. Science 165:1262-1264, 1969

Follet H, Li J, Phipps RJ, Hui S et al: Risedronate and alendronate suppress asteocyte apoptosis following cyclic fatigue loading. Bone 40(4):1172-1177, 2007

Frith JC, Monkkonen J, Auriola S et al: The molecular mechanism of action of antiresorptive and anti-inflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. Arthritis Rheum 44: 2201-2210, 2001

Kogianni G, Mann V, Ebetino F et al: Fas/CD95 is associated with glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis. Life Sci 75(24): 2879-2895, 2004

Lawson MA, Triffin JT, Ebetino FH: Potential bone mineral binding differences among bisphosphonates can be demonstrated by the use of hydroxyapatite column chromatography. J Bone Miner Res 20: 396- 398, 2005

Liberman UA, Weis SR, Broll J et al: Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. N Engl j med 333 (22):1437-1443, 1995

Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP et al: NBPs inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. J Bone Miner Res 13: 581-589, 1998

Marshall MJ, Wilson AS, Davie MW: Effects of (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1, 1-bisphosphonate on mouse osteoclasts. J Bone Miner Res 5: 955- 962, 1990

Masarachia P, Weinreb M, Balena R et al: Comparison of the distribution of 3-H aledronate and 3-H etidronate in rat and mouse bones. Bone 19: 281-290, 1996

Monkkonen H, Auriola S, Lehenkari P et al: A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide transocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. Br J Pharmacol 147: 437-445, 2006

Murakami H, Takahashi N, Sasaki T et al: A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. Bone 17: 137-144, 1995

Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ et al: Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. Bone 38(5): 617-627, 2006

Owens JM, Fuller K, Chambers TJ: Osteoclast activation: potent inhibition by the bisphosphonate aledronate through a nonresorptive mechanism. J Cell Physiol 172: 79-86, 1997

Parfitt A.M: The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease. Part I of IV parts: mechanisms of calcium transfer between blood and bone and their cellular basis: morphological and kinetic approaches to bone turnover. Metabolism 25: 809-844, 1976

Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, et al: Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. J Clin Invest 104: 1363-1374, 1999

Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T: Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. Bone 39(3):443-452, 2006

Plotkin LI, Goellner J, Vyas K et al: bisphosphonate analog that lacks anti-remodeling activity prevents osteocyte and osteoblast apoptosis in vivo [abstract]. J Bone Miner Res 22 [Suppl 1]:S4, 2007

Reginster JY, Mine HW, Sorensen OH et al: Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Osteoporos Int 11:83-91, 2000

Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL: Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. J Oral Maxillofac Surg 62: 527-34, 2004

Russell RG, Muhlbauer RC, Bisaz S et al: The influence of pyrophosphate , condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. Calcif Tissue Res 6(3):183-196, 1970

Russell RGG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann U, Kwaasi A et al: Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. Ann.N.Y.Acad. Sci. 2007; 1117: 209-257

Russell RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ: Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. Osteoporos 2008; 19: 733-759

Santini D, Vincenzi B, Avvisati G et al: Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. Clin Cancer Res 8: 1080–1084, 2002

Sato M, Grasser W: Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. J Bone Miner Res 5: 31- 40, 1990

Selander K, Lehenkari P, Vaananen HK: The effects of bisphosphonates on the resorption cycle of isolated osteoclasts. Calcif Tissue Int 1994; 55: 368- 375, 1994

Suda T, Nakamura I, Jimi E et al: Regulation of osteoclast function. J Bone Miner Res 12: 869-879, 1997

Vitte C, Fleisch H, Guenther HL.: Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. Endocrinology 137: 2324-2333, 1996

Watts NB, Harris ST, Genant HK et al: Intermittent cyclical editronate treatment of postmenopausal osteoporosis N Engl J Med 323(2): 73-79, 1990

Wood J, Bonjean K, Ruetz S et al: Novel Antiangiogenic Effects of the Bisphosphonate Compound Zoledronic Acid. JPET 302: 1055-1061, 2002

Διεύθυνση επικοινωνίας:
Καλύβας Δήμος
Γ' Σεπτεμβρίου 132,
115 21 Αθήνα,
Τηλ.: 210 8233608
e-mail: demkal@dent.uoa.gr

Address:
Kalyvas Dimos
132 3th Septemvriou str.,
115 21 Athens - Greece
Tel.: 210 8233608
e-mail: demkal@dent.uoa.gr