

LAVORO ORIGINALE

Effetti anabolici e di inibizione della produzione di interleuchina 6 indotti dal neridronato in colture di osteoblasti umani*

Anabolic effects and inhibition of interleukin 6 production induced by neridronate on human osteoblasts

A. Spreafico¹, B. Frediani¹, C. Capperucci¹, D. Gambera², P. Ferrata², F. Baldi¹, F. Chellini¹, S. Niccolini¹, L. Bocchi², R. Marcolongo¹

¹Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche, Sezione di Reumatologia, Università di Siena

²Dipartimento di Scienze Ortopedico-Riabilitative, Radiologiche e Otorinolaringoiatriche, Ortopediche e Traumatologiche, Policlinico "S. Maria alle Scotte" Siena

SUMMARY

Bisphosphonates (BPs) are pharmacological compounds widely used in the treatment of a variety of bone-related diseases, particularly where the bone-turnover is skewed in favour of osteolysis. The mechanisms by which BPs reduce bone-resorption directly acting on osteoclasts (OCs) are now largely clarified even at molecular level. The researches concerning the BPs effects on osteoblasts (OBs) have instead shown variable results.

Objectives: We have investigated the efficacy of neridronate (NER), an amino-BP, as anabolic agent on human OBs. Moreover, we have tried to verify if NER is able to negatively modulate the production of IL-6 on OBs stimulated or not by the pro-inflammatory cytokine IL-1 β .

Methods: We have tested if different concentrations of NER (from 10⁻¹¹M to 10⁻³M), added to primary human OB cultures, could affect the cells number, the endogenous cellular alkaline phosphatase (ALP) activity, the collagen I (COL-I) synthesis, the formation of mineralized nodules and the IL-6 production. Our experimental approach was performed testing a wide range of NER concentrations because, under physiological conditions, OBs seems to be exposed to variable and transient levels of the drug.

Results: Our results show that NER doesn't negatively affect in vitro the viability, proliferation and cellular activity of human OBs, even after 20 days of exposure to concentrations $\leq 10^{-5}$ M (therapeutic dose). In addition, NER seems to enhance the differentiation of cultured OBs in mature bone-forming cells. A maximum increase of COL-I synthesis (+25% after 4 days; $p < 0.05$), ALP activity (+50% after 10 days; $p < 0.01$) and mineralized nodules (+48% after 20 days; $p < 0.05$) was observed in cultures treated with NER 10⁻⁸M. A maximal reduction of IL-6 secretion (-24% on IL-1 β stimulated cultures and -29% on unstimulated cultures) was observed for NER 10⁻⁹ M.

Conclusions: These results encourage the use of neridronate in therapy of demineralizing metabolic bone disorders.

Reumatismo, 2006; 58(4):288-300

INTRODUZIONE

Losso è un tessuto continuamente rimodellato da processi di formazione e riassorbimento. In

soggetti umani normali, ad eccezione del periodo della crescita, questi due processi sono bilanciati in una condizione di omeostasi. Cambiamenti nella massa ossea possono essere quindi indotti farmacologicamente agendo specificatamente sulla formazione, sul riassorbimento o su entrambi contemporaneamente. I bisfosfonati (BF), una classe di agenti farmacologici correlati chimicamente al pirofosfato inorganico, sono utilizzati principalmente per inibire il riassorbimento osseo e per incrementare la massa ossea nel trattamento dell'osteoporosi (1, 2). A livello tissutale, tutti i BF de-

*Lavoro premiato al XLII Congresso Nazionale SIR, Verona 2005

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Adriano Spreafico

Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche

Sez. di Reumatologia Università di Siena

Policlinico S. Maria alle Scotte - 53100 Siena

E-mail: spreafico@unisi.it

terminano un aumento della densità di mineralizzazione (BMD) inibendo il riassorbimento ed il turnover osseo (3). A livello cellulare, il principale bersaglio dei BF sono gli osteoclasti, ossia le cellule responsabili del riassorbimento osseo. I BF possono agire sugli osteoclasti, sia direttamente inibendo la loro attività ed inducendo un processo apoptotico, sia indirettamente intervenendo su altre classi cellulari che controllano la proliferazione e l'attività osteoclastica. Recenti studi suggeriscono che l'effetto inibitorio osservato sul reclutamento dei precursori osteoclastici e sulla loro attivazione in seguito al trattamento con BF, possa essere dovuto, almeno in parte, all'azione diretta di questi farmaci sugli osteoblasti (4-10). Nonostante gli effetti diretti dei BF sugli osteoclasti siano stati ben analizzati e compresi anche a livello molecolare (11), le conclusioni sperimentali riguardanti gli effetti dei BF sull'attività osteoblastica sono ancora poco esaurienti. In letteratura sono stati sinora riportati risultati molto variabili, a volte anche contrastanti, riguardanti gli effetti dei BF sulla proliferazione degli osteoblasti (12), sul loro differenziamento (13-17), e sulla eventuale riduzione della secrezione osteoblastica di svariati fattori solubili, alcuni dei quali, come l'interleuchina IL-6, capaci di regolare sia l'osteoclastogenesi che l'attività osteoclastica (18). La maggior parte delle ricerche effettuate su questo argomento sono state compiute in condizioni sperimentali molto diverse, su modelli cellulari eterogenei di origine umana o animale, usando un varietà di BF sostanzialmente differenti in termini di potenza e meccanismo d'azione. L'impiego sperimentale di cellule animali o trasformate crea ovviamente molti problemi per l'estrapolazione dei risultati ottenuti all'essere umano. Per ovviare a questo problema, è molto importante utilizzare colture primarie di cellule umane (19, 20). La sperimentazione di un farmaco su questo tipo di colture permette di considerare molti parametri che influenzano la sensibilità e l'entità della risposta cellulare, quali ad esempio, l'età, il sesso e lo stato biologico del paziente dal quale le cellule derivano.

L'obiettivo di questo studio è stato di stabilire se il neridronato, un aminobisfosfonato particolarmente efficace che può essere somministrato per via parenterale intermittente (21, 22), abbia effetti biologici sulla vitalità, la proliferazione, ed il differenziamento di osteoblasti primari in vitro. A tale scopo, abbiamo voluto indagare gli effetti che diverse concentrazioni di neridronato (10^{-11} M- 10^{-3} M) possono comportare su colture di osteoblasti pro-

tratte per un periodo necessario al completamento del loro differenziamento osteogenico (20 giorni). Abbiamo quindi esposto colture osteoblastiche primarie, derivate da almeno 18 pazienti a storia clinica nota, a concentrazioni del farmaco ritenute essere raggiunte durante il trattamento terapeutico. Le colture osteoblastiche trattate sono state quindi analizzate misurando, in diversi intervalli di tempo, il grado della loro attività e differenziamento in termini di proliferazione, attività della fosfatasi alcalina (ALP), sintesi di collagene e formazione di noduli mineralizzati. Infine, è stata compiuta un'analisi preliminare per la valutazione di una eventuale riduzione della secrezione osteoblastica di IL-6 indotta dal neridronato su cellule stimolate e non stimolate con la citochina pro-infiammatoria IL-1 β .

MATERIALI E METODI

Campioni biologici

Sono stati analizzati gli effetti del neridronato su colture primarie di osteoblasti umani ottenute da osso trabecolare sano di pazienti (uomini e donne di età compresa tra i 56 e i 78 anni, con un'età media intorno ai 66 anni) che hanno subito interventi chirurgici in seguito a patologie articolari degenerative. I pazienti sono stati selezionati escludendo quelli che avevano ricevuto, nei due anni precedenti l'intervento, una terapia con bisfosfonati, una terapia ormonale o un trattamento con glucocorticoidi.

Bisfosfonato

Il neridronato (6-amino-1-idrossiexilidene-bisfosfonato, PM=299,16) è stato fornito, come composto puro, dall'Abiogen Pharma (Pisa, Italia). La stock solution (10^{-1} M) è stata ottenuta sciogliendo il neridronato in NaCl 0,9% a pH 6,8. Il calcolo delle dosi del bisfosfonato usate in coltura cellulare si è basato sulle dosi terapeutiche solitamente somministrate ai pazienti: somministrazione intravenosa di 50 mg/mese di neridronato. Teoricamente, la dose intravenosa viene effettivamente assorbita al 100%, ma circa il 60% di questa quantità viene rapidamente escreta nelle urine. Poiché la parte rimanente si diluisce in circa 5l di sangue, si può ritenere che la concentrazione circolante di neridronato sia di circa 4 μ g/ml ($\approx 1,3 \times 10^{-5}$ M/mese). Poiché a livello dell'osso l'adsorbimento del farmaco sembra essere molto più basso che a livello ematico, gli esperimenti a riguardo sono stati effettuati

saggiando un vasto range di concentrazioni di neridronato (da 10^{-11} M a 10^{-3} M) (23-25).

Colture cellulari

Le colture cellulari sono state ricavate da frammenti di osso trabecolare sano, provenienti da teste di femore di pazienti che hanno subito un intervento di protesi d'anca per osteoartrosi.

I frammenti di osso trabecolare sono stati lavati in tampone PBS per rimuovere residui di sangue e di matrice ossea e quindi trasferiti in una piastra Petri contenente terreno di coltura Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), (Gibco, Life Technologies, UK) con il 10% di siero fetale bovino (FCS), (Sigma Chemical Company), 2 mM L-Glutamina (Gibco), ed antibiotici (100 U penicillina/ml, 100 µg di streptomina/ml) (Gibco).

Le colture sono state messe in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata al 7% di anidride carbonica (26). Il terreno completo con FCS al 10% è stato cambiato dopo 7 giorni per permettere alle cellule di migrare dai frammenti e di disporsi sulla superficie della piastra di coltura. Il medium cellulare è stato cambiato nuovamente dopo 7 giorni e successivamente ogni 3 giorni. Le cellule hanno raggiunto la confluenza dopo circa 3-6 settimane. Lo strato di cellule primarie (E1), così ottenuto, è stato lavato tre volte in PBS e poi trattato per 5 min con una soluzione 0,05% di tripsina e 0,02% EDTA (Gibco) a 37°C. Le cellule, una volta staccate, sono state seminate ad una densità di 6×10^4 cellule/pozzetto in piastre da 6-12 pozzetti (Corning Costar, MA, USA) e coltivate in DMEM e FCS al 10%, fino a confluenza (E1P1). Il medium è stato cambiato circa due volte a settimana e dopo questo periodo, le cellule sono state lavate in PBS e incubate per almeno 48 ore con medium senza siero con lo 0,1% di BSA (Sigma). Durante il trattamento con il farmaco, il medium di coltura è stato cambiato 2 volte a settimana aggiungendo DMEM con FCS al 10% o UltrosorG (UG) al 2% (Gibco), contenente diverse concentrazioni di neridronato (da 10^{-11} M a 10^{-3} M). L'effetto di ogni concentrazione di neridronato è stato saggiato in triplicato per ogni diversa coltura cellulare.

Conta cellulare con Trypan blue

Le colture cellulari sono state trattate, dopo il raggiungimento della semi-confluenza, con diverse concentrazioni di neridronato (da 10^{-11} M a 10^{-3} M). Dopo differenti periodi di tempo dall'inizio del trattamento (0, 2, 4, 6, 10, 15 e 20 giorni), le cellule di ogni coltura sono state staccate con tripsina

e contaminate con una camera Neubauer utilizzando il metodo di colorazione vitale trypan blue.

Valutazione della proliferazione degli osteoblasti e saggio di tossicità

Per il saggio di proliferazione e di citotossicità cellulare è stato utilizzato un indicatore di crescita colorimetrico, basato sulla determinazione dell'attività metabolica cellulare (AlamarBlue Assay, Biosource International) (27). Tale metodo non è tossico nei confronti delle cellule ed è facilmente interpretabile. La forma ossidata dell'AlamarBlue è di colore blu scuro; dopo penetrazione all'interno delle cellule, il colorante si riduce virando dal blu al rosso; il cambiamento di colore è direttamente proporzionale alla proliferazione cellulare e può essere quantificato come variazione di assorbanza ottica a particolari lunghezze d'onda. Le cellule sono state seminate in piastre da 12 pozzetti ad una concentrazione di 3×10^4 cellule/pozzetto e incubate in DMEM a cui viene aggiunto FCS al 10% o UG al 2%. Dopo 2, 4 e 8 giorni dall'inizio del trattamento, è stato aggiunto l'Alamar Blue (soluzione 1:25 in DMEM con FCS al 10% o UG al 2%) e incubato per 6 ore a 37°C. Alla fine dell'incubazione, il medium è stato aspirato e trasferito su piastra da 96 pozzetti per la lettura allo spettrofotometro. La proliferazione cellulare è stata espressa in percentuale calcolando la differenza fra il valore di assorbanza letto a 570 nm (max D.O. per la forma ridotta) e il valore di assorbanza letto a 620 nm (max D.O. per la forma ossidata).

Misura delle proteine totali

Gli osteoblasti trattati con diverse concentrazioni di neridronato, sono stati lavati per due volte con PBS e il contenuto totale proteico è stato determinato sui lisati cellulari usando il saggio proteico Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). I valori ottenuti sono stati normalizzati con il numero relativo di cellule vitali.

Determinazione del pro-peptide C-terminale del Collagene di tipo I

L'effetto del neridronato sulla sintesi in vitro della matrice ossea è stato valutato misurando i livelli del propeptide C-terminale del collagene tipo I (PICP) usando il saggio ELISA Prolagen C (Metra Biosystems, CA, USA). Le colture di osteoblasti sono state seminate in piastre da 12 pozzetti e coltivate, dopo aver raggiunto la semi-confluenza, in assenza o presenza di diverse concentrazioni di neridronato (10^{-11} M a 10^{-4} M). Il PICP è

stato misurato nei sopranatanti raccolti ai giorni 2, 4 e 8 dalla data di somministrazione del farmaco. I valori del collagene di tipo I sono stati normalizzati con il numero relativo di cellule vitali come determinato negli esperimenti di proliferazione compiuti in parallelo.

Saggio biochimico della fosfatasi alcalina (ALP)

L'attività della ALP è stata misurata direttamente sul monostrato cellulare cresciuto in piastre da 12 pozzetti. Il medium cellulare è stato rimosso, le cellule sono state lavate per 3 volte con PBS e incubate sotto agitazione per 30 minuti a 37°C in 1 ml di p-nitrofenilfosfato 10 mM (Sigma). La reazione colorimetrica è stata quindi bloccata con NaOH 1N e la densità ottica del substrato è stata misurata in assorbenza a 405 nm. I valori dell'attività della ALP, sono stati normalizzati con il numero relativo di cellule vitali, determinato nella piastra da 12 pozzetti, usando il saggio di proliferazione precedentemente citato.

Formazione e mineralizzazione dei noduli

La formazione dei noduli mineralizzati è stata determinata per le colture di osteoblasti cresciute in piastre da 6 pozzetti, usando una colorazione con rosso alizarina S. Brevemente, il medium è stato aspirato dai pozzetti e le cellule sono state lavate 2 volte con PBS. In seguito le cellule sono state fissate con etanolo freddo al 70% (v/v) per un'ora; l'etanolo è stato quindi rimosso e le cellule sono state lavate 2 volte con acqua deionizzata. Le cellule sono state, quindi, colorate con rosso alizarina S 40 mM in acqua deionizzata (pH 4,2), per 10 minuti a temperatura ambiente. La soluzione è stata poi scartata per aspirazione e le cellule sono state lavate per 5 volte con acqua deionizzata. Le cellule sono state incubate in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente su un agitatore orizzontale e poi lavate nuovamente con PBS fresco. I noduli positivi alla colorazione presenti in ciascun pozzetto sono stati quindi contati con un microscopio a contrasto di fase. Per ciascun saggio, il numero di noduli è stato normalizzato al relativo numero di cellule vitali.

Dosaggio IL-6 mediante ELISA

Le cellule sono state seminate in piastre da 12 pozzetti ad una concentrazione di 3×10^4 cellule/pozzetto, una volta raggiunta la confluenza, sono state pre-incubate per 1 ora con neridronato a varie concentrazioni (10^{-12} M, 10^{-9} M, 10^{-7} M e 10^{-5} M) in DMEM con 0.5% di FCS. In seguito, alcune col-

ture sono state stimulate con IL-1 β , (Sigma) ad una concentrazione di 5 μ g/ml. I sopranatanti sono stati quindi raccolti dopo 48h di trattamento e l'IL-6 è stata saggiata utilizzando un ELISA IL-6 human kit (Biosource). Tutti i valori sono stati normalizzati per il numero di cellule per pozzetto.

Analisi Statistica

I dati sono stati espressi come valori medi \pm SD di tutte le colture che hanno ricevuto lo stesso trattamento. Le differenze tra i valori sono state analizzate per la significatività statistica con l'analisi della varianza (ANOVA) usando il t-test di Student. I livelli di significatività sono stati corretti con il metodo di Bonferroni per le comparazioni multiple. I valori di $P < 0.05$ sono stati considerati statisticamente differenti dal controllo.

RISULTATI

Colture primarie di osteoblasti

In questo studio, sono stati analizzati gli effetti del neridronato su almeno 18 differenti colture primarie di osteoblasti umani ottenuti da osso trabecolare di pazienti che erano stati sottoposti ad intervento chirurgico di protesi all'anca. Tutti gli esperimenti sono stati compiuti aggiungendo differenti concentrazioni di neridronato in colture di osteoblasti umani al primo passaggio culturale. Come descritto da Rattner e al. (20), la composizione del medium culturale influenza strettamente il differenziamento cellulare. In quest'ottica, abbiamo scelto di utilizzare un sostituto del siero denominato Ultroser G per ottenere cellule osteoblastiche completamente differenziate (20-28). L'uso dell'UG ha consentito di ottenere un elevato livello di maturazione cellulare confermato da prove di biochimiche per l'attività della fosfatasi alcalina e la secrezione di osteocalcina (dati non riportati). La differente composizione del medium cellulare influenza anche la velocità di formazione e la dimensione dei noduli mineralizzati. La crescita in UG ha quindi consentito il conteggio dei noduli mineralizzati come strutture tridimensionali ben definite.

Effetto del neridronato sulla proliferazione osteoblastica

Nella figura 1 (a-b) sono riportate le curve di crescita ottenute in seguito al trattamento con diverse concentrazioni di neridronato su differenti colture di osteoblasti. I grafici riportano le osservazioni

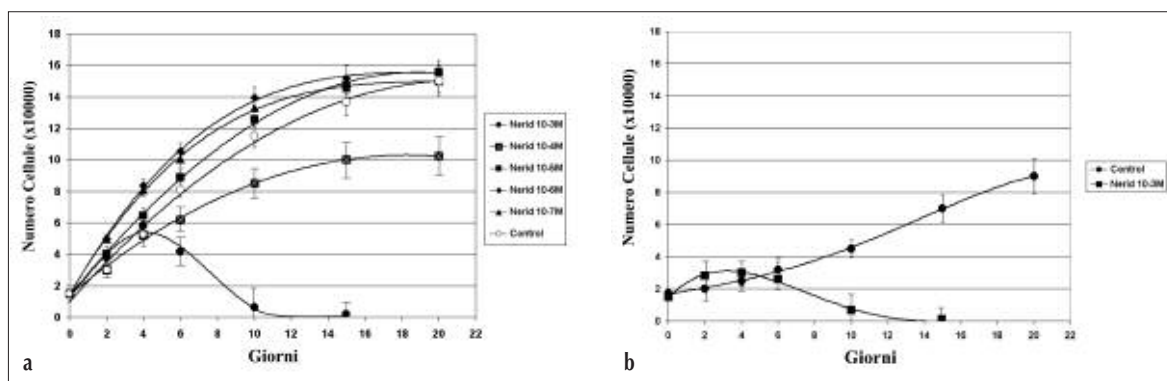


Figura 1 - Effetti delle diverse concentrazioni di neridronato su colture di osteoblasti umani. Il neridronato è stato testato sulle colture di osteoblasti umani coltivate in medium con FCS 10% (a) o UG 2% (b). I grafici mostrano le colture, trattate con concentrazioni di neridronato da 10⁻³ M a 10⁻¹¹ M, analizzate a 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20 giorni. In ogni esperimento, le stesse concentrazioni di neridronato sono testate in triplo. Le curve per concentrazioni di neridronato <10⁻⁷M (a) e <10⁻⁴M (b) non sono state riportate poiché si sovrappongono alla curva del controllo. Differenze statisticamente significative sono state osservate dal giorno 4 al giorno 20, per concentrazioni 10⁻³M-10⁻⁴M ($p < 0.001$ M) e 10⁻⁵M-10⁻⁷M ($p < 0.0001$ M). In (b) per la concentrazioni 10⁻³M dopo 8 giorni di trattamento ($p < 0.0001$ M).

compiute su colture cresciute in medium colturali con l'aggiunta di FCS 10% (Fig. 1a) o di UG 2% (Fig. 1b). Come si nota nella figura 1a, le cellule cresciute in FCS sono molto più sensibili all'azione del neridronato. Rispetto alla curva di controllo, la concentrazione di neridronato 10⁻³ M è citotossica e induce la morte cellulare, anche se un evidente distacco delle cellule è stato riscontrato solo dopo 4 giorni di esposizione al farmaco. Il neri-

dronato alla concentrazione 10⁻⁴ M probabilmente inibisce la mitosi o aumenta la morte cellulare. Comunque, il conteggio delle cellule vitali rivela che, a questa concentrazione del farmaco, una porzione sostanziale delle cellule (circa il 65% rispetto alla coltura non trattata di controllo) sembra sopravvivere in coltura per più di 20 giorni. Un lieve, ma statisticamente significativo, incremento della popolazione cellulare rispetto al controllo è stato os-

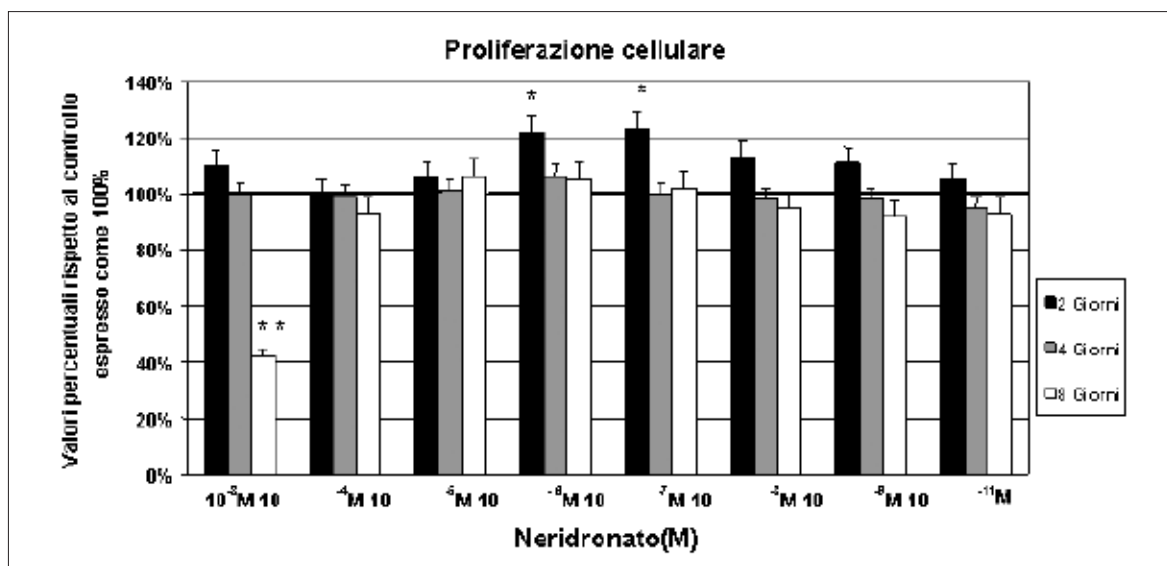


Figura 2 - Effetti di diverse concentrazioni di neridronato sulla proliferazione di colture di osteoblasti umani. Le cellule sono state coltivate in piastre da 12 pozzetti con l'aggiunta di FCS 10% sia in assenza che in presenza di neridronato. Il grafico mostra i valori medi ottenuti da 18 differenti campioni cellulari dopo 2, 4 e 8 giorni di coltura. I dati sono espressi in percentuale considerando il controllo come il 100%. Le concentrazioni statisticamente significative sono indicate con * ($p < 0,05$).

servato fra i 4 e i 20 giorni di trattamento per concentrazioni di neridronato fra 10^{-7} M e 10^{-5} M. La proliferazione cellulare in presenza dell'UG al 2% (Fig. 1b) è invece più lenta rispetto a quella in FCS (Fig. 1a). Un effetto tossico del neridronato sulle colture trattate con UG è risultato evidente solo per concentrazioni vicine o superiori a 10^{-3} M. Concentrazioni inferiori a 10^{-4} M non inducono variazioni del numero di cellule per ogni coltura trattata, rispetto al controllo.

Per estendere i nostri dati sulla proliferazione ad un numero statisticamente rilevante di colture cellulari derivate da diversi campioni ossei, abbiamo utilizzato la metodica colorimetrica dell'Alamar Blue. Questa tecnica ci ha permesso di monitorare la proliferazione cellulare di almeno 18 differenti colture cellulari in diversi periodi di tempo. I risultati, riportati nella figura 2, confermano sostanzialmente i dati ottenuti con la metodologia del Trypan blue. Per le cellule cresciute con FCS al 10%, è stata riscontrata una crescita statisticamente rilevante (+20%; $p < 0,05$) solo per concentrazioni di neridronato comprese fra 10^{-7} M e 10^{-6} M dopo 2 giorni di trattamento; mentre un evidente decremento nella proliferazione cellulare (circa 60%; $P < 0,001$) è stato osservato per il neridronato alla

concentrazione 10^{-3} M dopo 8 giorni di trattamento. La proliferazione in UG non presenta variazioni rispetto al controllo per nessuna delle concentrazioni di neridronato aggiunte.

Contenuto proteico totale

Nelle colture cresciute in terreno contenente FCS, il livello totale di proteine aumenta rispetto al controllo dopo 3 giorni di trattamento per concentrazioni 10^{-9} M- 10^{-6} M di neridronato aggiunto. Al giorno 14, il contenuto proteico cellulare diminuisce per tutte le concentrazioni saggate raggiungendo livelli simili al controllo. Nelle colture cresciute con UG non si notano variazioni rispetto al controllo.

Sintesi di collagene di tipo I

La figura 3 riporta l'effetto del neridronato sulla sintesi di collagene di tipo I valutata attraverso la misurazione delle concentrazioni di PICP nel soprannatante di coltura. La secrezione di collagene risulta aumentata (+25%; $p < 0,05$) dopo 4 giorni di trattamento per concentrazioni di neridronato da 10^{-7} M a 10^{-5} M. Dopo 8 giorni di incubazione, la sintesi di collagene di tipo I si riduce per tutte le concentrazioni del farmaco saggate a va-

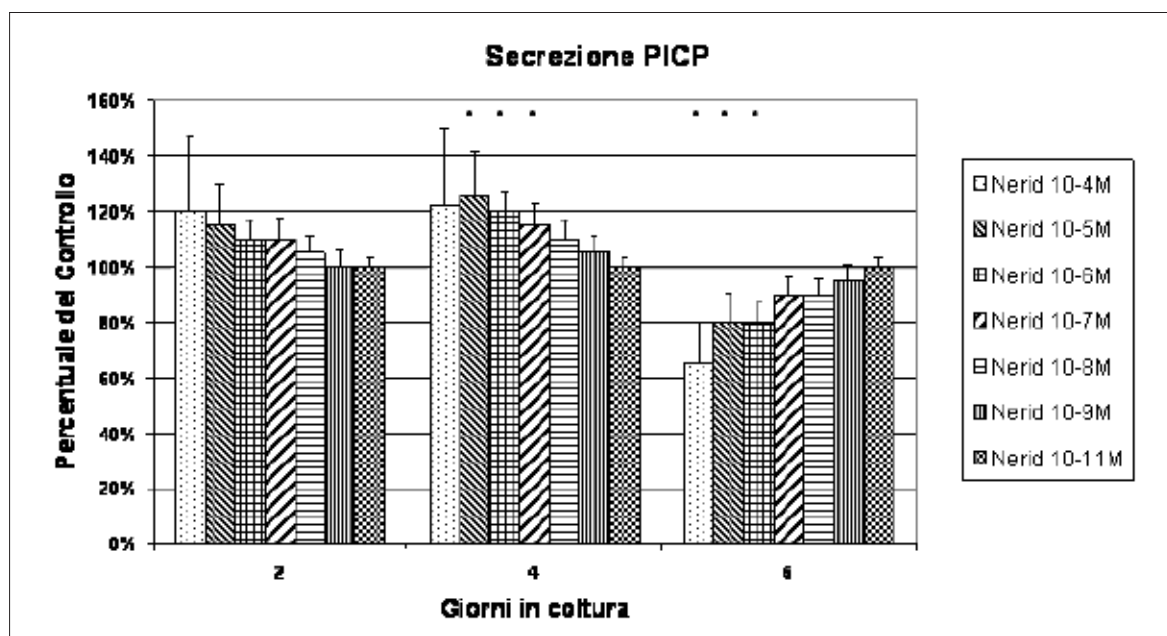


Figura 3 - Effetti di differenti concentrazioni di neridronato sulla sintesi di collagene di tipo I. Le cellule sono state coltivate in piastre da 12 pozzetti con l'aggiunta di FCS 10% sia in assenza che in presenza di varie concentrazioni di neridronato. Il PICP è stato misurato nel terreno culturale dopo 2, 4 e 8 giorni di trattamento. I valori del PICP sono stati normalizzati per il numero di cellule di ogni coltura. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo sono stati ottenuti dalla media dei valori riscontrati per 6 differenti colture. Le concentrazioni statisticamente significative sono indicate con * ($p < 0,05$).

lori uguali o più bassi del controllo (dal -15% al -30%; $p < 0,05\%$, per concentrazioni di neridronato tra $10^{-6}M$ e $10^{-4}M$). Non sono state osservate variazioni significative per cellule cresciute in UG 2%.

Saggio biochimico della fosfatasi alcalina (ALP)
L'ALP è un importante enzima di membrana che viene espresso negli osteoblasti maturi contribuendo alla mineralizzazione e stimolando la precipitazione di fosfato di calcio; l'aumento dell'at-

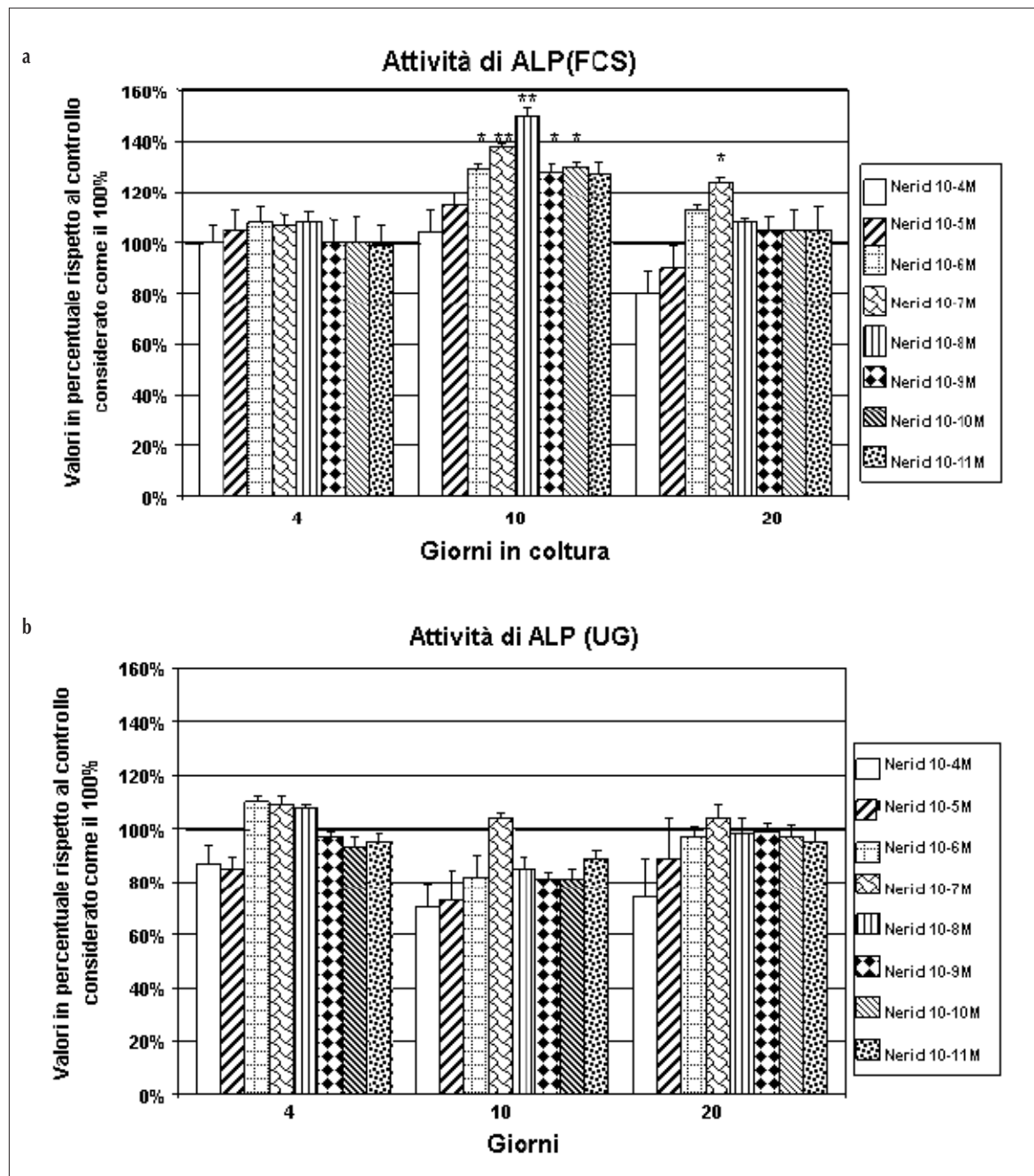


Figura 4 - Effetti del neridronato sull'attività della ALP, in colture di osteoblasti umani. Gli osteoblasti umani sono cresciuti in medium con FCS 10% o UG 2%. Il grafico mostra gli effetti nel tempo (4, 10, 20 giorni) di diverse concentrazioni di neridronato ($10^{-11}M$ - $10^{-4}M$). I dati rappresentano la media dei valori ottenuti da 10 differenti colture. Valori statisticamente significativi sono rappresentati con * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

tività fosfatasica è conseguente alla proliferazione o all'aumentata attività degli osteoblasti, come accade, per esempio, in seguito ad una lesione del tessuto osseo con fenomeni di decalcificazione. Per essere sicuri che l'attività della ALP misurata fosse relativa a quella prodotta dalle sole cellule vive, gli esperimenti sono stati condotti direttamente sul monostrato cellulare. Sono stati eseguiti esperimenti dose-risposta per esaminare gli effetti del neridronato sull'attività della ALP. Per poter valutare se il neridronato avesse effetti diversi su cellule a differenti stadi di maturazione, il farmaco è stato aggiunto a colture cellulari cresciute in medium normali con l'aggiunta di FCS al 10% (Fig. 4a) o con UG al 2% (Fig. 4b). I principali valori ottenuti da diverse colture di osteoblasti, sono stati espressi in percentuale, considerando l'attività enzimatica in assenza di neridronato, come il 100%. Variazioni significative per l'attività della ALP, paragonate al controllo, sono state osservate principalmente per cellule cresciute con FCS dopo 10 giorni di coltura. A questo stadio l'incremento nell'attività della ALP (+50%; $P < 0,01$), è risultato massimo per una concentrazione di neridronato 10^{-8} M. Dopo 20 giorni, l'attività della ALP risulta stabilizzarsi intorno ai valori di controllo, con la sola eccezione delle colture trattate con ne-

ridronato alla concentrazione 10^{-7} M (+22%; $P < 0,05$). Non sono state osservate variazioni significative di ALP per cellule cresciute in medium a cui è stato aggiunto UG 2%.

Formazione e mineralizzazione dei noduli

La velocità di formazione dei noduli ossei mineralizzati è stata determinata per colture di osteoblasti, cresciute in piastre multipozzetto (6 pozzetti), usando il saggio del rosso alizarina S, questa colorazione è specifica per i sali di calcio presenti nei noduli.

Per convenienza sono state contate solo le cellule cresciute con UG, infatti la conta dei noduli di mineralizzazione di cellule cresciute con FCS è abbastanza complessa, a causa delle dimensioni ridotte dei noduli di mineralizzazione. Come mostrato nella figura 5, un aumento della formazione dei noduli rispetto al controllo (+40%; $p < 0,05$), è stato osservato dopo 4 giorni di coltura ad una concentrazione di neridronato di 10^{-4} M. Nei giorni seguenti la percentuale di formazione dei noduli diviene simile al controllo. Comunque, dopo 20 giorni di coltura, è stato osservato un ulteriore incremento nella formazione dei noduli di mineralizzazione per concentrazioni di neridronato tra 10^{-8} M (+44%; $p < 0,05$) e 10^{-7} M (+24%; $p < 0,05$).

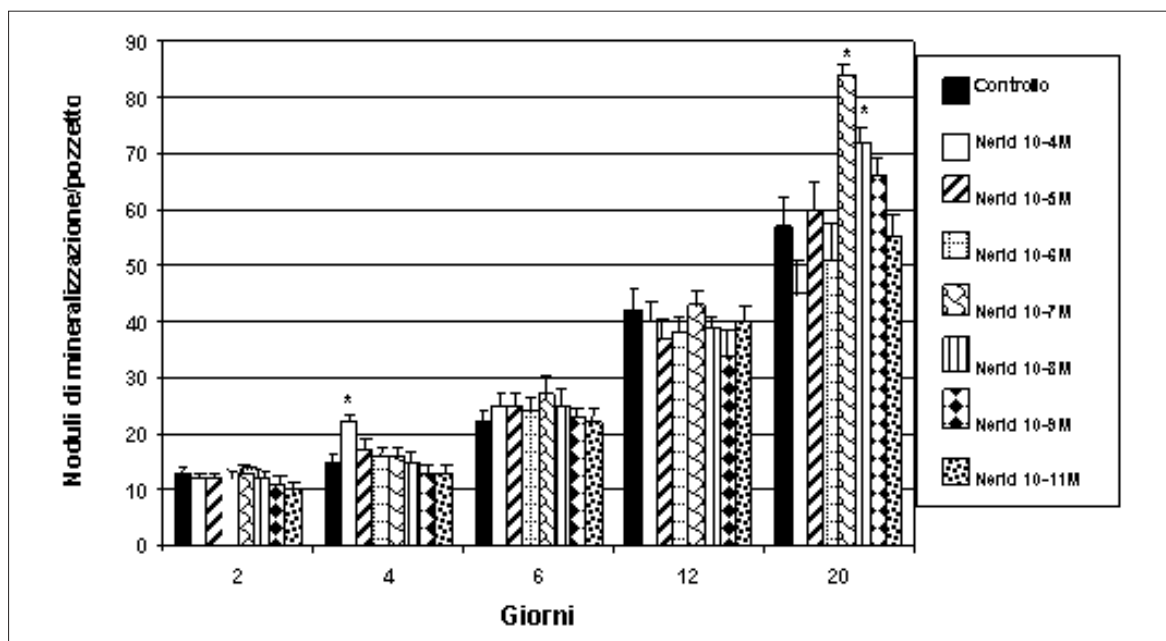


Figura 5 - Effetti del neridronato sulla formazione dei noduli di mineralizzazione. In questa figura sono riportati gli effetti del neridronato su colture di osteoblasti umani cresciute con UG 2%. Le cellule sono coltivate sia in presenza che in assenza di neridronato a varie concentrazioni. Il grafico mostra il numero dei noduli mineralizzati, positivi al rosso alizarina S, testata dopo 2, 4, 6, 12 e 20 giorni. I dati sono espressi come percentuale rispetto ai controlli. I valori statisticamente significativi sono rappresentati con * ($p < 0,05$).

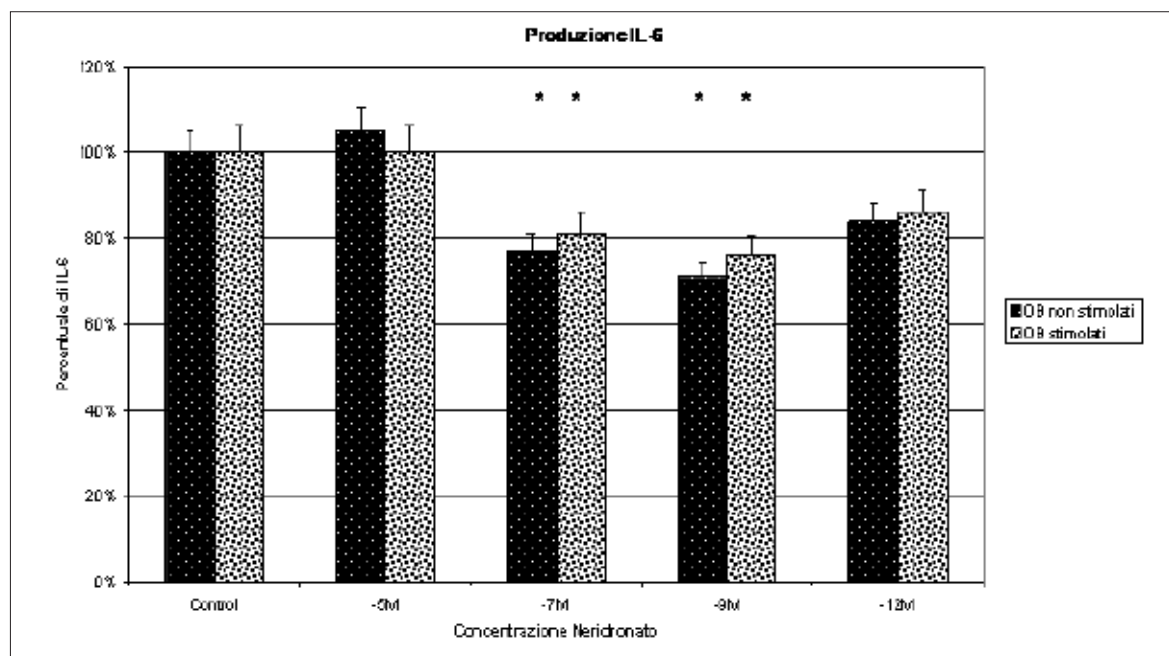


Figura 6 - Effetti del neridronato sulla produzione di IL-6. In questa figura sono riportati gli effetti del neridronato su colture di osteoblasti umani cresciute in medium con lo 0,5% di FCS con o senza la presenza di IL-1 β (5 ng/ml). Le cellule sono coltivate sia in presenza che in assenza di neridronato a varie concentrazioni (10⁻⁵M, 10⁻⁷M, 10⁻⁹M, 10⁻¹²M). Il grafico mostra la quantità di IL-6 rilasciata dalle cellule nel medium di coltura. I dati sono espressi come percentuale rispetto ai controlli. I valori statisticamente significativi sono rappresentati con * ($p < 0,05$).

Inibizione della produzione di IL-6

La valutazione dell'effetto di inibizione è stata compiuta saggiando 4 diverse concentrazioni di neridronato su 4 differenti colture stimulate o no con 5 ng/ml di IL-1 (Fig. 6). Per questa stimolazione le cellule producono una quantità media di IL-6 circa 50 volte più alta del valore basale. Una inibizione significativa per la secrezione di IL-6 basale è stata osservata per concentrazioni di neridronato 10⁻⁷M (-23 \pm 4%; $p < 0,05\%$) e 10⁻⁹M (-29 \pm 5%; $p < 0,05\%$). Nelle colture stimulate con IL-1 sono stati ottenuti valori di inibizione significativi per concentrazioni di neridronato 10⁻⁷M (-19 \pm 3%; $p < 0,05\%$) e 10⁻⁹M (-24 \pm 5%; $p < 0,05\%$).

DISCUSSIONE

I BF, analoghi strutturali del pirofosfato, sono stati estensivamente studiati sia in vivo che in vitro per valutare e comprendere i loro effetti sui tessuti e le cellule ossee. La maggior parte degli studi che li riguardano sono stati tuttavia rivolti a quello che è sembrato l'effetto più evidente di questi composti sul metabolismo osseo, ossia una potente inibizione del riassorbimento osseo mediato dagli osteo-

clasti. In questo lavoro abbiamo tentato di indagare gli effetti del neridronato, sulla vitalità, la proliferazione, il differenziamento e l'attività modulatoria di osteoblasti umani ottenuti da diversi pazienti. I nostri obiettivi sono stati quindi i seguenti:

- a) verificare se il neridronato sia tossico per gli osteoblasti anche dopo un'esposizione prolungata con concentrazioni elevate del farmaco;
- b) confermare in osteoblasti umani maturi gli effetti anabolici positivi osservati in precedenti studi su osteoblasti murini (24);
- c) valutare se il farmaco agisce sugli osteoblasti inibendo la loro capacità di sintesi di citochine, come l'IL-6, stimolanti la proliferazione e l'attività osteoclastica.

Gli osteoblasti utilizzati nelle nostre colture sono stati ottenuti da frammenti di osso trabecolare di pazienti con una storia clinica ben definita. In molti sistemi colturali di cellule ossee, il differenziamento osteogenico è dipendente da glucocorticoidi. Il grado di questa dipendenza varia a seconda della specie e dello stato di maturazione delle cellule, che riflette, almeno in parte, la zona ed il tessuto da cui provengono (osso trabecolare o midollo osseo). Per questa ragione, oltre ad effettuare le prove su colture cresciute con un terreno conte-

nente FCS, abbiamo ritenuto opportuno utilizzare il composto UG, un sostituto del siero contenente steroidi e in particolare glucocorticoidi, per avere un modello sperimentale basato su cellule osteoblastiche umane ad un avanzato stato di differenziamento (29-33).

I nostri esperimenti sono stati compiuti saggiando un'ampia gamma di concentrazioni del neridronato poiché, in condizioni fisiologiche, gli osteoblasti sembrano essere esposti a livelli variabili e transienti del farmaco. Il calcolo delle dosi da saggiare del bisfosfonato è stato basato sulla dose terapeutica normalmente somministrata ai pazienti (circa 10^{-5} M). L'impiego di dosi inferiori (10^{-11} M- 10^{-5} M) si è basato sul fatto che l'adsorbimento del farmaco a livello osseo avviene ad una concentrazione molto minore rispetto al livello ematico. Uno studio riguardante l'incorporazione ossea di un bisfosfonato (alendronato) ha indicato la possibilità che gli osteoblasti possano essere transitoriamente esposti ad alte concentrazioni locali (fino a 10^{-3} M) nella lacuna di riassorbimento (34). Durante la loro azione di degradazione ossea, gli osteoclasti possono infatti liberare il bisfosfonato dall'osso, aumentando teoricamente la sua effettiva concentrazione locale. Tuttavia, una prolungata esposizione degli osteoblasti a concentrazioni elevate del farmaco appare improbabile poiché la maggior parte del bisfosfonato rilasciato sembra rimanere intrappolata all'interno della lacuna di riassorbimento per essere poi nuovamente captata ed internalizzata dagli osteoclasti (35).

Gli effetti del neridronato ottenuti nei nostri esperimenti su colture di osteoblasti umani differiscono da quanto osservato in esperimenti analoghi svolti su osteoblasti di topo. In termini di proliferazione e vitalità, gli osteoblasti umani risultano meno sensibili alle alte concentrazioni di neridronato anche dopo un prolungato trattamento con il farmaco (20 giorni). Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti per altri BF (etidronato e alendronato) saggiati su osteoblasti umani (6-15). Nei nostri esperimenti, la proliferazione delle colture di osteoblasti cresciute in FCS sembra essere lievemente incrementata per concentrazioni di neridronato da 10^{-7} M a 10^{-6} M, solo nei primi 2 giorni di trattamento. Al contrario, osteoblasti cresciuti in presenza di UG e quindi ad uno stadio di maturazione più elevato rispetto a quelli cresciuti in FCS, non sono risultati essere influenzati nella loro attività di proliferazione per nessuna delle concentrazioni di neridronato inferiore a 10^{-4} M. In contrasto con i limitati e transitori effetti sulla pro-

liferazione osteoblastica, il trattamento con neridronato a concentrazioni tra 10^{-10} M e 10^{-6} M sembra indurre, nelle colture di osteoblasti considerate ad uno stadio intermedio di differenziamento (36), un aumento della sintesi proteica totale, della sintesi di collagene di tipo I, e dell'attività della ALP.

L'ALP è un enzima importante per la sintesi della matrice ossea extra-cellulare, poiché contribuisce alla mineralizzazione biologica idrolizzando gli esteri fosforici, stimolando la precipitazione del fosfato di calcio, e idrolizzando il pirofosfato inorganico (un inibitore della formazione di idrossiapatite). L'aumento osservato dell'attività della ALP, indica che il neridronato, come altri BF, può incrementare il differenziamento degli osteoblasti facendoli passare da uno stadio di intensa proliferazione ad uno stato di attiva sintesi della matrice (37). Gli effetti positivi del neridronato sul differenziamento degli osteoblasti, sembrano essere confermati dall'incremento della formazione dei noduli ossei mineralizzati, osservato dopo 20 giorni di trattamento.

I nostri studi dimostrano quindi che il neridronato non sembra interferire negativamente con la vitalità, la proliferazione e l'attività delle cellule anche dopo una prolungata esposizione con il farmaco alle concentrazioni più elevate che possono essere teoricamente raggiunte in vivo. Inoltre, alle concentrazioni ritenute efficaci sugli osteoclasti, il neridronato sembra aumentare il differenziamento degli osteoblasti in cellule a più intensa attività osteogenica. Questi risultati sono in accordo con un recente studio sull'aumento della produzione di un altro marker di differenziamento, l'osteocalcina, indotto dal neridronato su osteoblasti umani (38). I meccanismi molecolari attraverso i quali i BF possono influire sulla proliferazione ed il differenziamento osteoblastico sono stati chiariti solo parzialmente. Secondo alcuni autori, i BF esercitano un effetto anti-apoptotico su cellule osteoblastiche trattate con $\text{TNF}\alpha$ e dexametasone (39). Questo effetto appare essere mediato da una rapida fosforilazione e attivazione delle chinasi di tipo ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) attraverso una via Ras-indipendente. Un altro studio (40), ha suggerito che l'inibizione della via cellulare del mevalonato, ritenuta essere la principale azione farmacologica degli ammino-BF, comporti un accumulo di metaboliti intermedi che possono attivare le ERK 1/2 in maniera Ras dipendente.

L'insieme delle osservazioni riguardanti il diretto contributo che i BF possono esercitare in vitro su-

gli osteoblasti può in parte spiegare il loro positivo contributo alla mineralizzazione ossea osservata in vivo (6, 16, 41, 42).

I dati di istomorfometria riguardo a questo argomento non sono ancora convincenti poiché, a livello della lacuna di riassorbimento, il contributo della sintesi di nuova matrice da parte degli osteoblasti rispetto all'inibizione del riassorbimento osteoclastico è molto difficile da valutare. Alcuni autori (43-45) hanno dimostrato che l'incremento di densità minerale ossea (bone mineral density, BMD) osservato in pazienti trattati con N-BF è dovuto in larga parte ad un'augmentata mineralizzazione delle unità di rimodellamento osseo (basic structure units, BSU). Questo effetto sembra essere causato da una sostanziale riduzione della velocità di rimodellamento che probabilmente permette la persistenza di vecchie BSU, che hanno già raggiunto un completo livello di mineralizzazione. Comunque altri meccanismi d'azione, come la contrazione dello spazio di rimodellamento a livello di ciascuna BSU, sembrano contribuire ad un incremento della massa ossea.

È stato infatti osservato, che il guadagno della massa ossea ottenuto in seguito ad una terapia con BF viene mantenuto anche per alcuni anni dopo la fine della somministrazione del farmaco, indipendentemente dal ritorno della velocità del turn-over osseo ai valori precedenti il trattamento (46). Non si può quindi escludere che, a livello di singole BSU, gli N-BF possano determinare un bilancio osseo positivo sostenuto nel tempo, riducendo la velocità di erosione osteoclastica ed eventualmente incrementando la sintesi osteoblastica di matrice ossea.

L'IL-6, oltre a essere un potente fattore di crescita e differenziamento per i linfociti B e T riveste un ruolo importante nello sviluppo osteoclastico. Per tale motivo, questa citochina risulta estremamente coinvolta nei meccanismi patogenetici di malattie demineralizzanti quali l'osteoporosi (47, 48). Diversi stu-

di sono stati svolti per stabilire se i BF possono modulare negli osteoblasti la sintesi di fattori, come l'IL-6, che promuovono l'attività degli osteoclasti. Questi lavori mostrano però risultati contrastanti. L'alendronato sembra stimolare la produzione di IL-6 in una linea cellulare osteoblastica stimolata con IL-1 (49), mentre altri lavori mostrano un effetto inibitorio dell'etidronato, del clodronato, dell'alendronato e dello zoledronato (18, 50) o nessun effetto per l'etidronato e l'alendronato (51).

In conclusione, ogni BF possiede caratteristiche biologiche e fisico-chimiche proprie ed appare molto difficile estrapolare dati univoci da esperimenti compiuti su differenti tipi cellulari saggiati con differenti composti e vari criteri di stimolazione. Il nostro studio si limita pertanto a riportare evidenze sperimentali ottenute per un singolo composto in un modello cellulare umano che rappresenta il più possibile le condizioni fisiologiche in vivo. In queste condizioni, è stata osservata una riduzione significativa della produzione di IL-6 in cellule stimulate e non stimulate con IL-1 β . Pertanto, attraverso una interazione indiretta con gli osteoblasti, il neridronato sembra essere in grado di esercitare un'azione positiva sulla massa ossea anche mediante una riduzione della secrezione di IL-6. Tale azione potrebbe risultare particolarmente efficace in quelle patologie, come l'osteoporosi sistemica e periarticolare, in cui l'IL-6 contribuisce al processo di riassorbimento osseo. Questi risultati devono essere ovviamente supportati da ulteriori indagini che permettano di comprendere i meccanismi cellulari alla base del fenomeno osservato e l'entità, nonché il decorso temporale, dell'espressione genica delle citochine modulate. Tale argomento è attualmente uno dei nostri principali oggetti di studio.

In conclusione, i risultati di questo studio incoraggiano l'uso del neridronato per terapie di patologie scheletriche demineralizzanti.

RIASSUNTO

I Bifosfonati sono agenti farmacologici con elevate capacità antirassorbitive utilizzati per il trattamento di malattie caratterizzate da un elevato turnover osseo. Recenti studi hanno ipotizzato che, oltre ad una azione farmacologica diretta sugli osteoclasti, questi composti possano interagire con gli osteoblasti stimolandone il metabolismo, il differenziamento e la modulazione di fattori che promuovono o inibiscono la proliferazione e l'attività degli osteoclasti. In questo lavoro è stato dimostrato in vitro che concentrazioni terapeutiche del neridronato, un ammino-bisfosfonato, sono ben tollerate dagli osteoblasti e ne possono incrementare la proliferazione e l'attività osteogenica. Inoltre, particolari concentrazioni del farmaco sono in grado di inibire la produzione osteoblastica di IL-6. L'insieme di questi risultati incoraggiano l'uso di questo farmaco in patologie ossee demineralizzanti.

Parole chiave - Neridronato, bisfosfonato, osteoblasto, osteoporosis, IL-6.

Key words - Neridronate, bisphosphonate, osteoblast, osteoporosis, IL-6.

BIBLIOGRAFIA

1. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998; 19: 80-100.
2. Corrado A, Cantatore FP. The bisphosphonates: chemical characteristics, skeletal biological effects and extra-skeletal effects. *Reumatismo* 2005; 57: 142-53.
3. Rodan GA. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 375-88.
4. 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.
5. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 1998; 22: 455-61.
6. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanderas ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 2000; 60: 6001-7.
7. Mathov I, Plotkin LI, Sgarlata CL, Leoni J, Bellido T. Extracellular signal-regulated kinases and calcium channels are involved in the proliferative effect of bisphosphonates on osteoblastic cells in vitro. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 2050-6.
8. Halasy-Nagy JM, Rodan GA, Rezka AA. Inhibition of bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone* 2001; 29: 553-9.
9. Roschger P, Rinnerthaler S, Yates J, Rodan GA, Fratzl P, Klaushofer K. Alendronate increases degree and uniformity of mineralization in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone of osteoporotic women. *Bone* 2001; 29: 185-91.
10. Vierendeck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Gründker C, Hofbauer LC. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 680-6.
11. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *P Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 133-8.
12. Khokher MA, Dandona P. Diphosphonates inhibit human osteoblast secretion and proliferation. *Metabolism* 1989; 38: 184-7.
13. Klein BY, 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.
14. Felix R, Fleisch H. Increase in alkaline phosphatase activity in calvaria cells cultured with diphosphonates. *Biochem J* 1979; 183: 73-81.
15. Garcia-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farre M, Diez A, Marinoso ML, et al. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 1998; 22: 233-9.
16. Fromigué O, Body JJ. Bisphosphonates influences the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 539-46.
17. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004; 25: 4105-15.
18. 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.
19. Spreafico A, Frediani B, Capperucci C, Chellini F, Paffetti A, D'Ambrosio C, et al. A proteomic study on human osteoblastic cells proliferation and differentiation. *Proteomics in press*.
20. Rattner A, Sabido O, Massoubre C, Rasclé F, Frey J. Characterization of human osteoblastic cells: influence of the culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; 33: 757-62.
21. Adami S, Gatti D, Colapietro F, Fracassi E, Braga V, Rossini M, et al. Intravenous neridronate in adults with osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 126-30.
22. Braga V, Gatti D, Colapietro F, Battaglia E, Righetti D, Prizzi R, et al. Intravenous intermittent neridronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Bone* 2003; 33: 342-5.
23. Usui T, Tanaka S, Sonoda T, Ozawa Y, Teramura K, Nakamura E, et al. Drug disposition of incadronate, a new bisphosphonate in rats with bone metastases. *Xenobiotica* 1997; 27: 479-487.
24. Gandolfi MG, Pugnali A, Mattioli Belmonte M, Muzzarelli R, De Benedittis A, et al. Osteoblast behaviour in the presence of bisphosphonates: ultrastructural and biochemical in vitro studies. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 327-3.
25. Porras AP, Holland SD, Gertz BJ. Pharmacokinetics of Alendronate. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36: 315-28.
26. Gallagher JA, Gundle R, Beresford JN. 1996. Isolation and culture of bone-forming cells (osteoblast) from human bone. In: *Human cell culture protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 233-62.
27. Ahmed SA, Gogal Jr MR, Walsh JE. A new rapid and simple non radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 1994; 170: 211-24.
28. Hankey DP, McCabe RE, Doherty MJ, Nolan PC, McAlinden MG, Nelson J, et al. Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum. *Acta Orthop Scand* 2001; 72: 395-403.
29. Durant S, Duval D, Hassid J, Homo-Delarche J. Mouse embryo fibroblast proliferation and prostaglandin production in Medium supplemented with fetal bovine serum or serum substitutes (Ultrosor SF and G): role of glucocorticoids. *J Steroid Biochem* 1989; 33: 1103-10.
30. Green E, Todd B, Heath D. Mechanism of glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase gene ex-

- pression in osteoblast-like cell. *Eur J Biochem* 1990; 188: 147-53.
31. Wong MM, Rao LG, Ly H, Hamilton L, Tong J, Sturtridge W, et al. Long term effects of physiologic concentration of dexamethasone on human bone derived cells. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 803-13.
 32. Frediani B, Spreafico A, Capperucci C, Chellini F, Gambera D, Ferrata P, et al. Long term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures *Bone* 2004; 35: 859-69.
 33. Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40: 74-83.
 34. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991; 88: 2095-105.
 35. Thompson K, Rogers MJ, Coxon FP, Crockett JC. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles following fluid-phase endocytosis. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 1624-32.
 36. Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, et al. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 75: 22-35.
 37. Lian JB, Stein GS, Canalis E, Robey PG, Boskey AD. Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 1999: 14-29.
 38. Corrado A, Cantatore FP, Grano M, Colucci S. Neridronate and human osteoblasts in normal, osteoporotic and osteoarthritic subjects. *Clin Rheumatol* 2005; 24: 527-34.
 39. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999; 104: 1363-74.
 40. Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Yasutomi C, Nakamuta H, Koida M. Incadronate and etidronate accelerate phosphate-primed mineralization of MC4 cells via ERK1/2-Cbfa1 signaling pathway in a Ras-independent manner: further involvement of mevalonate-pathway blockade for incadronate. *Jpn J Pharmacol* 2001; 86: 86-96.
 41. Tsuchimoto M, Azuma Y, Higuchi O, Sugimoto I, Hirata N, Kiyoki M, et al. Alendronate modulates osteogenesis of human osteoblastic cells in vitro. *Jpn J Pharmacol* 1994; 66: 25-33.
 42. Pan B, To LB, Farrugia AN, Findlay DM, Green J, Gronthos S, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. *Bone* 2004; 34: 112-23.
 43. Chavassieux PM, Arlot ME, Reda C, Wei L, Yates AJ, Meunier PJ. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* 1997; 15, 100: 1475-80.
 44. Chavassieux PM, Arlot ME, Roux JP, Portero N, Dafotis A, Yates AJ, et al. Effects of alendronate on bone quality and remodeling in glucocorticoid-induced osteoporosis: a histomorphometric analysis of transiliac biopsies. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 754-62.
 45. Boivin GY, Chavassieux PM, Santora AC, Yates J, Meunier PJ. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone* 2000; 27: 687-94.
 46. Landman JO, Hamdy NA, Pauwels EK, Papapoulos SE. Skeletal metabolism in patients with osteoporosis after discontinuation of long-term treatment with oral pamidronate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 3465-8.
 47. Sugiyama T. Involvement of interleukin-6 and prostaglandin E2 in periarticular osteoporosis of postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *J Bone Miner Metab* 2001; 19: 89-96.
 48. Verbruggen A, De Clerck LS, Bridts CH, Van Offel JF, Stevens WJ. Flow cytometrical determination of interleukin 1beta, interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha in monocytes of rheumatoid arthritis patients; relation with parameters of osteoporosis. *Cytokine* 1999; 11: 869-74.
 49. Sanders JL, Tarjan G, Foster SA, Stern PH. Alendronate/interleukin-1beta cotreatment increases interleukin-6 in bone and UMR-106 cells: dose dependence and relationship to the antiresorptive effect of alendronate. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 786-92.
 50. Derenne S, Amiot M, Barille S, Collette M, Robillard N, Berthaud P, et al. Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 2048-56.
 51. Engel E, Serrano S, Marinoso ML, Lloreta J, Ulloa F, Nogues X, et al. Alendronate and etidronate do not regulate interleukin 6 and 11 synthesis in normal human osteoblasts in culture. *Calcif Tissue Int* 2003; 72: 228-35.