



Mechanizmy działania leków antykatabolicznych stosowanych w osteoporozie

Mechanisms of action of anticatabolic drugs used in osteoporosis therapy

Edyta Kryśkiewicz, Roman S. Lorenc

Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej, Instytut „Pomnik — Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

Streszczenie

Procesy przebudowy tkanki kostnej leżą u podstawy prawidłowego funkcjonowania układu szkieletowego i całego organizmu. Zachwianie równowagi pomiędzy procesami kościotworzenia a resorpcją, na korzyść resorpcji kostnej, może prowadzić do obniżenia wytrzymałości mechanicznej kości i do złamań. Głównym celem działania leków antykatabolicznych jest normalizacja nadmiernej aktywności resorpcyjnej osteoklasta i podwyższonego obrotu kostnego. Molekularne mechanizmy działania leków z tej grupy wykorzystują różne punkty w sygnalizacji zewnętrznej i wewnętrznej prowadzącej do różnicowania bądź aktywności resorpcyjnej osteoklastów. W niniejszej pracy krótko je opisano. (*Endokrynol Pol* 2009; 60 (2): 134–144)

Słowa kluczowe: mechanizm działania, leki antykataboliczne, resorpcja kostna, osteoklast, osteoporoza

Abstract

Bone remodeling is essential for skeletal and the whole body health. Imbalance in skeletal turnover, so that bone resorption exceeds bone formation, may lead to reduction in bone strength and increase fractures risk. The main target of anticatabolic therapy is to normalize increased osteoclasts activity and bone turnover. Molecular mechanisms of action of this class of drugs are related with different points in cellular signaling pathways that control osteoclasts differentiation and resorbing activity. These mechanisms are briefly described in our review. (*Pol J Endocrinol* 2009; 60 (2): 134–144)

Key words: mechanism of action, anticatabolic therapy, bone resorption, osteoclast, osteoporosis

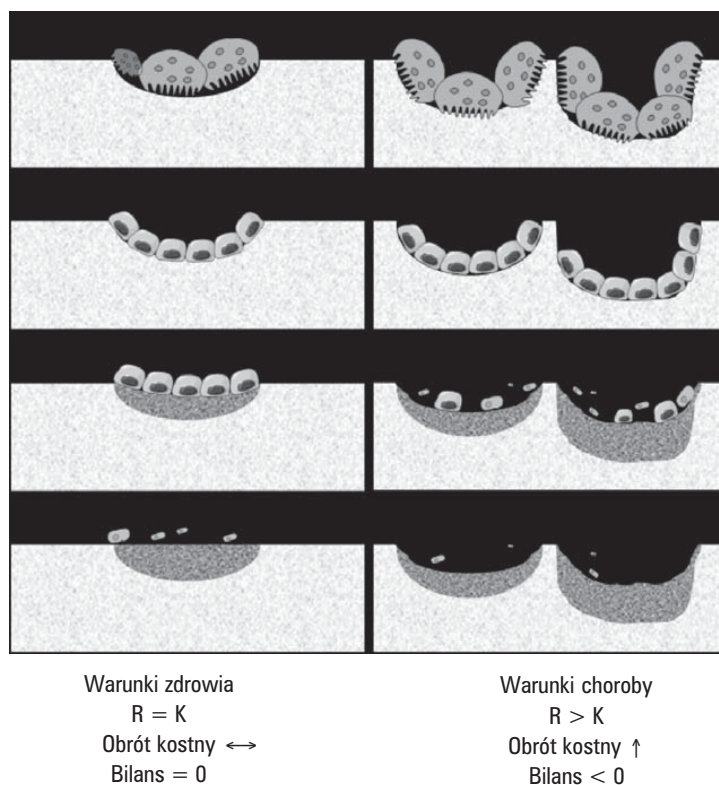
Wstęp

Procesy przebudowy tkanki kostnej leżą u podstawy prawidłowego funkcjonowania układu szkieletowego podczas wzrostu kości w rozwijającym się organizmie, przebudowy kości w organizmie dojrzałym, wyrzynania się zębów, gojenia się złamań, a także dla utrzymania homeostazy wapniowo-fosforanowej warunkującej zdrowie całego organizmu. W młodym rosnącym organizmie ilość tworzonej kości w miejsce kości usuniętej jest większa (przewaga kościotworzenia nad resorpcją), co skutkuje zwiększaniem masy kostnej. Gdy kościec osiąga zaprogramowane genetycznie rozmiary, ustala się pewna równowaga pomiędzy kościotworzeniem a resorpcją, a masa kostna pozostaje stała. Jeśli jednak równowaga między resorpcją a kościotworzeniem zostanie zachwiana na korzyść resorpcji kostnej, wówczas dochodzi do obniżenia masy kostnej oraz jakości kości, co prowadzi do złamań niskourazowych. Już sama fizjologia metabolizmu kości zakłada pewną nierównowagę pomiędzy fazą resorpcji a kościotworze-

niem. Osteoklasty są komórkami bardzo sprawnymi, dużymi, działają bardzo szybko, natomiast osteoblasty odpowiedzialne za odbudowę zresorbowanej kości potrzebują na to zdecydowanie więcej czasu. Jednak ścisła kontrola obu procesów oraz komunikacja pomiędzy komórkami kostnymi nie dopuszcza do zaburzenia równowagi metabolicznej kości w stanie zdrowia. W patomechanizmie osteoporozy, na skutek utraty kontroli nad funkcjonowaniem osteoklastów, osteoblastów czy innych komórek kostnych i/lub komunikacji między nimi, dochodzi do rozprzęgnięcia procesu resorpcji i kościotworzenia oraz wzmożonej resorpcji i przyspieszenia obrotu kostnego, czyli ilości nowo powstających miejsc przebudowy (BMU, *basic multicellular unit*) w jednostce czasu. Jednocześnie w miarę starzenia się organizmu procesy tworzenia kości stają się mniej efektywne. Skutkuje to zmniejszeniem ilości tworzonej kości i zwiększeniem ilości kości resorbowanej, co powoduje, że każdy epizod wewnętrznej przebudowy kości wiąże się z usunięciem pewnej ilości tkanki kostnej. Prowadzi to do utraty masy kości i uszkodzenia



Prof. dr hab. med. Roman S. Lorenc, Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej, Instytut „Pomnik — Centrum Zdrowia Dziecka”, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa, tel.: 022 815 17 76, 022 815 15 74, faks: 022 815 17 89, e-mail: biochemia@czd.pl



Rycina 1. Utrata masy kostnej w patomechanizmie osteoporozy (R — resorpcja kostna; K — kościotworzenie). Opracowanie własne na podstawie Seeman i wsp. [1]

Figure 1. Bone mass loss in the pathomechanism of osteoporosis (R — bone resorption; K — bone formation). Modified from Seeman et al. [1]

jej struktury, co dodatkowo potęguje zwiększony obrót kostny (większa ilość jam resorpcyjnych na danej powierzchni w danym momencie, skrócony czas mineralizacji kości) [1] (ryc. 1).

Przedmiot niniejszej pracy stanowią mechanizmy działania stosowanych w leczeniu osteoporozy leków antykatabolicznych, których miejscem działania są różne elementy biorące udział w różnicowaniu i metabolizmie dojrzałego osteoklasta.

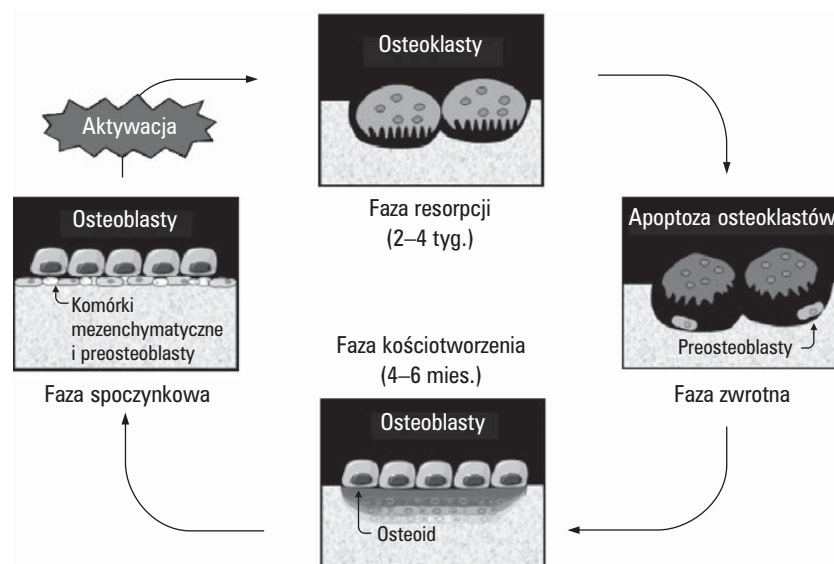
Metabolizm kostny

Kość stanowi żywą tkankę, bardzo aktywną metabolicznie. Można wyróżnić dwa główne procesy składające się na metabolizm tkanki kostnej: modelowanie strukturalne (*modeling*) i wewnętrzną przebudowę (*remodeling*). Do okresu osiągnięcia szczytowej masy kostnej w metabolizmie kostnym przeważa modelowanie strukturalne, co prowadzi do zmian wielkości i kształtu kości [1]. W organizmie dojrzałym przeważa proces wewnętrznej przebudowy [1]. Główną funkcją wewnętrznej przebudowy jest utrzymanie odpowiedniej masy kostnej i zapewnienie homeostazy wapniowo-fosforanowej organizmu, a także utrzymanie kości

w odpowiedniej kondycji poprzez regenerację kości (usuwanie mikrouszkodzeń, wymiana „starej” kości na „nową”) oraz ciągłą adaptację kości do wywieranych na nią obciążeń [2].

Wewnętrzna przebudowa kości

Proces przebudowy kości dotyczy zarówno kości korowej, jak i beleczkowej. Jest on zaangażowany we wzrost kości oraz jej regenerację w jednostkach przebudowy (BMU, *basic multicellular unit*) (ryc. 2) [1]. Przebudowę kości poprzedza przerwanie przez mikropęknięcie ciągłości kanalików utworzonych przez wypustki cytoplazmatyczne osteocytów, które zapewniają osteocytom łączność między sobą oraz osteoblastami w stanie spoczynku, czyli komórkami wyściełającymi (*lining cells*). Prowadzi to do apoptozy osteocytów. Jest to sygnał dla komórek wyściełających o miejscu i zakresie uszkodzenia i o konieczności jego usunięcia. Komórki wyściełające uwalniają czynniki lokalne (w tym RANKL), które są sygnałem dla komórek prekursorowych osteoklastów do migracji w miejsce mikropęknięcia i różnicowania w osteoklasty (osteoklastogeneza). Jednocześnie komórki wyściełające wycofują się, odsłaniając powierzchnię kości, która ma być usunięta. Dojrzałe osteoklasty re-



Rycina 2. Schemat procesu wewnętrznej przebudowy kości w obrębie jednostki przebudowy (BMU). Opracowanie własne na podstawie Seeman i wsp. [1]

Figure 2. Scheme of internal bone remodeling in basic multicellular unit (BMU). Modified from Seeman et al. [1]

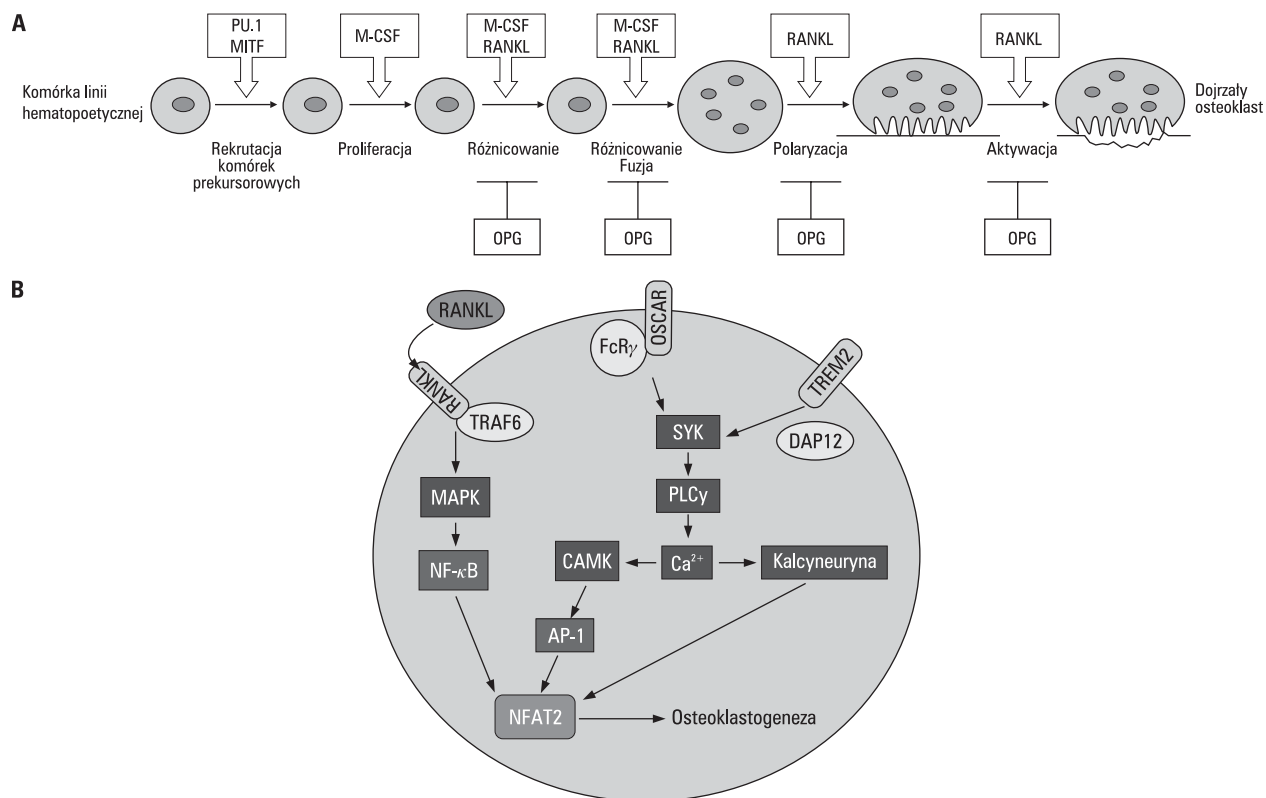
sorbują macierz kostną wraz z mikropęknięciem, drążąc jamę resorpcyjną. Jest to faza resorpcji, która trwa około 2–4 tygodni i kończy się apoptozą osteoklastów. Po tym okresie następuje krótka faza odrotu, w której jama resorpcyjna zostaje wyścielona komórkami kościotwórczymi, czyli osteoblastami. Osteoblasty następnie produkują osteoid (faza kościotworzenia), który jest stopniowo mineralizowany. Po około 4–6 miesiącach BMU zostaje wypełnione w pełni zmineralizowaną kością. Osteoblasty uwiecznione w obrębie nowo powstałej macierzy kostnej przekształcają się w osteocyty, inne natomiast po zakończeniu produkcji osteoidu umierają lub ulegają przemianie w komórki wyścielające [1].

Osteoklastogeneza

Osteoklastogeneza jest złożonym procesem, na który składa się rekrutacja komórek prekursorowych i ich różnicowanie oraz fuzja preosteoklastów w olbrzymie formy wielojądrzaste i aktywacja niedojrzałych osteoklastów [3] (ryc. 3).

Prekursorami osteoklastów są hematopoetyczne komórki macierzyste, z których, obok osteoklastów, mogą powstawać megakariocyty, granulocyty oraz monocyty lub makrofagi [3]. Aby z komórek prekursorowych powstały osteoklasty, niezbędna jest obecność dwóch kluczowych cytokin: czynnika stymulującego powstawanie kolonii makrofagów (M-CSF, *macrophage colony stimulating factor*) oraz ligandu RANK RANKL (*RANK ligand*) [4]. Na pierwszym etapie osteoklastogenezy M-CSF stymuluje proliferację oraz zapobiega apoptozie prekursorów osteoklastów. Na tym etapie

ważną rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne, między innymi: czynnik transkrypcyjny PU.1 (*PU.1 transcription factor*) oraz czynnik transkrypcyjny związany z małoczem (MITF, *microphthalmia-associated transcription factor*) [3]. Czynnik transkrypcyjny PU.1 reguluje transkrypcję genów zarówno dla M-CSF, jak i RANKL. Ponadto, wchodząc w interakcję z MITF reguluje również transkrypcję dla genów charakterystycznych dla osteoklastów, jak gen katepsyny K, winianoopornej kwasnej fosfatazy (TRAP, *tartrate-resistant acid phosphatase*) oraz receptora immunoglobulinowego związanego z osteoklastem (OSCAR, *osteoclast associated immunoglobulin-like receptor*) [3]. Produkowany głównie przez osteoblasty RANKL jest kluczowym mediatorem na trzech pozostałych etapach: różnicowaniu, fuzji oraz aktywacji osteoklastów. RANKL jest ligandem dla receptora błonowego RANK (receptor stymulujący jądrowy czynnik κB ; *receptor activator of nuclear factor κB*) obecnego na powierzchni osteoklastów już na wczesnych etapach ich różnicowania. Połączenie RANKL z RANK wywołuje kaskadę sygnałów wewnątrz powstającego lub dojrzałego osteoklasta, niezbędną dla jego różnicowania lub aktywności resorpcyjnej [5]. Innym receptorem dla RANKL jest osteoprotegeryna (OPG, *osteoprotegerin*). Jest to rozpuszczalny receptor współzawodniczący z RANK, który wiążąc się z RANKL, zapobiega jego wiązaniu się z RANK i hamuje różnicowanie i funkcjonowanie osteoklastów [5] (ryc. 3A). Ujawniono, że RANK współdziała także z innymi receptorami, takimi jak OSCAR oraz receptor wyzwalający ekspresowany na komórkach szpikowych 2 (TREM-2, *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) [6]. Dotychczas nie poznano



Rycina 3. Schemat procesu osteoklastogenezy. **A.** Sygnalizacja cytokin zewnątrzkomórkowych. **B.** Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa. Opracowanie własne na podstawie Tolar i wsp. [5] i Datta i wsp. [6]

Figure 3. Scheme of osteoclastogenesis. **A.** Extracellular cytokine signalling. **B.** Intracellular signalling. Modified from Tolar et al. [5] and Datta et al. [6]

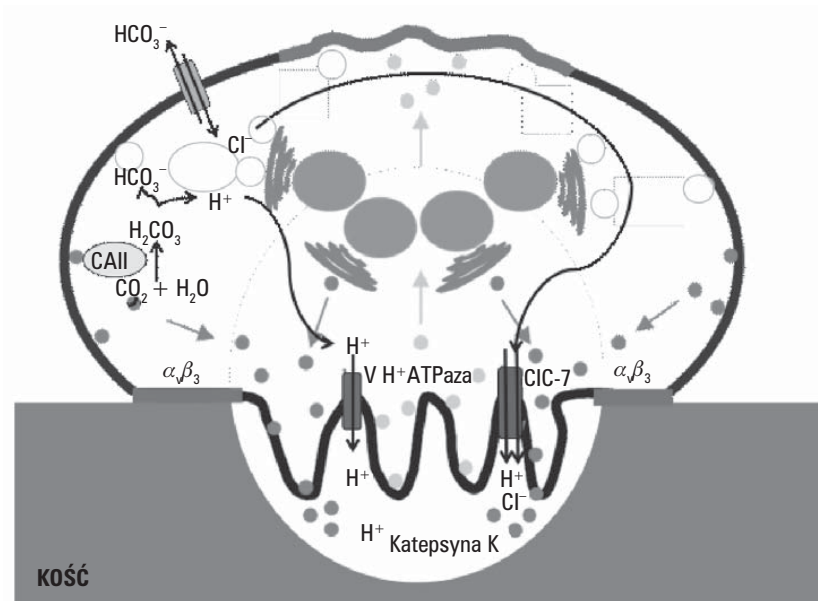
dokładnego mechanizmu współdziałania RANK, OSCAR i TREM-2 [6]. Wiadomo jednak, że stymulacja tych receptorów powoduje fosforylację białek receptora γ rozpoznającego region Fc immunoglobulin (FcR γ , Fc receptor γ) oraz białkowego aktywatora genu DNAX (DAP-12, DNAX activation protein), a następnie aktywację fosfolipazy C γ (PLC γ , phospholipase C γ) i wzrost stężenia wapnia wewnątrz komórki [6]. Sygnał wapniowy powoduje aktywację czynnika jądrowego dla zaktwowanych komórek T 2 (NFAT2, nuclear factor for activated T cells 2) [6]. Aktywacja NFAT2 skutkuje różnicowaniem osteoklastów [5]. Oddziaływanie RANKL z RANK może aktywować NFAT2 również w alternatywny sposób — z udziałem białek TRAF-6, c-Jun oraz c-Fos [6]. Czynniki powiązane z receptorem dla TNF (TRAF-6, TNF receptor associated factor) wpływa na aktywność kinazy aktywowanej mitogenami (MAPK, mitogen activated protein kinase), dla których celem jest czynnik transkrypcyjny AP-1 (heterodimer składający się z c-Jun i c-Fos) [5] (ryc. 3B).

Faza resorpcji — aktywność resorpcyjna dojrzałych osteoklastów

Faza resorpcji składa się z kilku etapów: migracji osteoklastów w miejsce, gdzie ma się odbyć resorpcja kost-

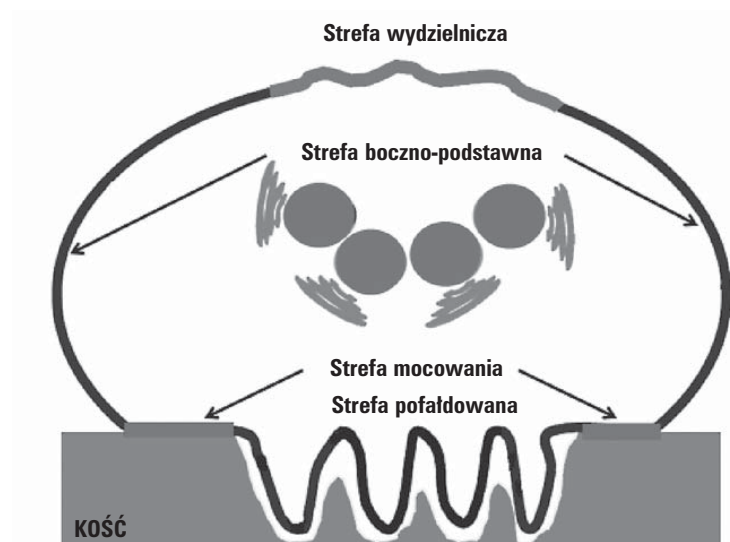
na, umocowania się osteoklastów na powierzchni kości, polaryzacji komórki i wyodrębnienia wyspecjalizowanych struktur błonowych, rozpuszczenia minerału kostnego, degradacji organicznej macierzy kostnej, usunięcia produktów katabolizmu oraz apoptozy osteoklastów lub przejścia w stan uśpienia [7] (ryc. 4).

Po przemieszczeniu się osteoklastów w obszar kości, gdzie ma się odbyć proces jej resorpcji, komórka osteoklasta ulega polaryzacji, a błona komórkowa tworzy wyspecjalizowane domeny błonowe: strefę mocowania, strefę pofałdowaną, bazolateralną (boczno-podstawną) oraz strefę wydzielniczą [7] (ryc. 5). Strefę mocowania (sealing zone) osteoklasta do kości stanowią podosomy. Struktury te zawierają filamenty aktynowe oraz integryny, głównie $\alpha_3\beta_3$ [5]. Integryny rozpoznają specyficzne sekwencje aminokwasowe RGD (arginina-glicyna-asparaginian) występujące w białkach macierzy kostnej (jak osteopontyna czy osteokalcyna) i wiążąc się z nimi tworzą bardzo szczelne połączenie pomiędzy ciałem osteoklasta a powierzchnią kości [6]. Integryny prawdopodobnie także biorą udział w migracji osteoklastów oraz usuwaniu produktów degradacji macierzy kostnej [7]. Następnie każdy z osteoklastów tworzy pofałdowaną domenę resorpcyjną (ruffled border). Jest to wyspecjalizowane organellum powstające



Rycina 4. Schemat działania dojrzałego osteoklasta. Kolorem szarym zaznaczono ruch pęcherzyków transcytotycznych, kolorem czarnym — pęcherzyków lizosomalnych. Opracowanie własne na podstawie Väänänen i wsp. [7]

Figure 4. Scheme illustrating function of mature osteoclast. Grey arrows indicate movements of transytotic vesicles, black arrows indicate movements of lysosomal vesicles. Modified from Väänänen et al. [7]



Rycina 5. Błonowe domeny funkcjonalne osteoklasta. Opracowanie własne na podstawie Väänänen i wsp. [7]

Figure 5. Membrane domains in osteoclast. Modified from Väänänen et al. [7]

poprzez fuzję wewnątrzkomórkowych kwaśnych pęcherzyków zawierających specyficzne metaloproteiny oraz lizosomalne proteiny cysteinowe (w tym katepsynę K), z błoną komórkową przylegającą do kości [7]. Środowisko w jamie resorpcyjnej jest aktywnie zakwaszane do pH około 4. Odbywa się to następująco: anhidraza węglanowa II (CAII) syntetyzuje kwas węglowy (H_2CO_3) na terenie cytoplazmy osteoklasta z CO_2 i H_2O , który natychmiast dysocjuje na jon wodorowę-

glanowy (HCO_3^-) oraz proton (H^+) [5]. Protony transportowane są do jamy resorpcyjnej aktywnie przez wakuolarną pompę protonową zależną od ATP ($V H^+ ATPaza$), obecną w domenie pofałdowanej [5]. Jednocześnie nadmiar jonów HCO_3^- jest usuwany z komórki osteoklasta na zewnątrz przez antyport jonów HCO_3^-/Cl^- obecny w błonie boczno-podstawnej, a napływające jony chlorkowe Cl^- transportowane są do jamy resorpcyjnej za pomocą symportu jonów H^+/Cl^-

(CIC-7) [7]. Po rozpuszczeniu nieorganicznej składowej kości, enzymy proteolityczne z udziałem katepsyny K mogą zacząć degradować białka macierzy kostnej [7]. Produkty degradacji są następnie usuwane z jamy resorpcyjnej na drodze transcytozy przez domenę wydzielniczą znajdującą się na szczycie komórki osteoklasta [5]. Cykl resorpcyjny kończy apoptoza osteoklastów lub przejście w stan uśpienia. Przypuszcza się, że istnieją pewne sensory w błonie pofałdowanej osteoklasta, które reagują na podwyższone stężenie Ca^{2+} w jamie resorpcyjnej jako skutek rozpuszczania hydroksyapatytu [8]. Odpowiedzią na pobudzenie sensorów wapniowych jest gwałtowne uwolnienie Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego na teren cytoplazmy osteoklasta i napływ Ca^{2+} z jamy resorpcyjnej do wnętrza komórki [8]. Wzrost stężenia Ca^{2+} powoduje aktywację śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (NOS, *nitric oxide synthase*). Lokalna produkcja tlenu azotu (NO, *nitric oxide*) powoduje odrywanie się osteoklastów od powierzchni kości i ich cofanie [8]. Jednak badania nad mechanizmami działania leków antykatabolicznych, których jednym z efektów jest apoptoza osteoklastów, nasuwają inne propozycje. W przypadku estrogenów czynnikiem proapoptotycznym jest transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β , *transforming growth factor β*), natomiast bisfosfoniany kierują osteoklasty na drogę apoptozy przez zahamowanie szlaku miewalonowego [4].

Mechanizmy działania preparatów antykatabolicznych

Głównym celem działania leków antykatabolicznych jest normalizacja nadmiernej aktywności resorpcyjnej osteoklasta i podwyższonego obrotu kostnego. Należy jednak wyraźnie zaznaczyć, że prawidłowo przebiegający proces resorpcji kostnej jest niezbędny dla zdrowia układu kostnego, a także całego organizmu.

Estrogeny oraz selektywne modulatory receptora estrogenowego

Pomenopauzalny niedobór estrogenów jest główną przyczyną wzmożonej utraty masy kostnej w osteoporozie pomenopauzalnej. Brak estrogenów wzmagają resorpcję kostną poprzez stymulację osteoklastogenezy, aktywności osteoklastów oraz aktywacji nowych miejsc przebudowy kości przy jednoczesnym zahamowaniu apoptozy osteoklastów. Skutkuje to zwiększoną liczbą głębszych jam resorpcyjnych w danym czasie na danej powierzchni kości oraz perforacją kości prowadzącą do przerwania ciągłości beleczek kostnych. Mediatorami tych zdarzeń jest wiele cytokin sprzyjających różnicowaniu, aktywności oraz przeżywaniu osteoklastów, a których nadprodukcję obserwuje się przy niedoborach estrogenów (interleukiny 1 [IL-1, *interleukin1*], IL-6,

M-CSF, czynnika martwicy nowotworu α [TNF- α , *tumor necrosis factor α*], RANKL) [9]. Obserwacje te stały się jasną przesłanką, aby w leczeniu osteoporozy uzupełniać niedobory estrogenów, stosując hormonalną terapię zastępczą (HTZ) lub związki naśladujące ich działanie — selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERM, *selective estrogen-receptor modulators*). Klasyczny mechanizm działania estrogenów polega na regulacji (stymulacji lub hamowaniu) transkrypcji określonych genów poprzez jądrowy receptor estrogenowy (ER, *estrogen receptor*). Zidentyfikowano dwa podstawowe typy receptora estrogenowego: ER α oraz ER β . Po związaniu ligandu (estrogenu lub SERM) następuje homo- (α/α lub β/β) lub heterodimeryzacja (α/β) receptora. Kompleks ligand-dimer ER wiąże się ze specyficznymi sekwencjami elementów odpowiedzi estrogenowej (ERE, *estrogen response element*), obecnymi w miejscu regulatorowym genów docelowych, i bezpośrednio wpływa na ekspresję genu lub pośrednio — przez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi, które dopiero po związaniu się z kompleksem ligand-dimer ER są zdolne do regulacji transkrypcji odpowiednich genów. Ponadto specyficzne koregulatory (koaktywatory i korepresory) mogą potęgować lub hamować działanie receptora [10, 11]. Znane są także niegenomowe mechanizmy działania estrogenów, gdzie odpowiedzią na oddziaływanie receptora z ligandem jest aktywacja lub inhibicja wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych [10, 11]. Estrogeny i SERM hamują osteoklastogenezę oraz aktywność resorpcyjną osteoklastów pośrednio (poprzez osteoblasty) lub bezpośrednio. Receptory estrogenowe obecne są w komórkach szpiku kostnego, osteoblastach, osteoklastach i ich prekursorach [10, 11]. W badaniach *in vitro* oraz *in vivo* dowiedziono, że estrogeny hamują produkcję przez osteoblasty cytokin stymulujących osteoklastogenezę i aktywność resorpcyjną osteoklastów (IL-1, IL-6, TNF- α , M-CSF oraz RANKL) oraz zwiększają produkcję OPG, która hamuje różnicowanie i dojrzewanie osteoklastów [11, 12]. Estrogeny mogą wpływać także bezpośrednio na aktywność resorpcyjną osteoklastów przez hamowanie syntezy i uwalnianie lizosomalnych enzymów degradujących macierz kostną, a także kierować osteoklasty na drogę apoptozy, w którym to efekcie pośredniczy produkowany przez osteoblasty TGF- β [11]. Selektywne modulatory receptora estrogenowego charakteryzują się specyficznością tkankową i w niektórych tkankach są agonistami estrogenów, a w innych antagonistami lub w ogóle nie wykazują aktywności [8].

Bisfosfoniany

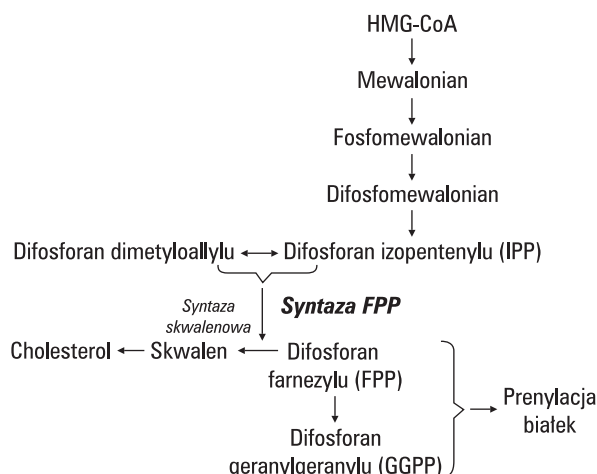
Mechanizm działania bisfosfonianów zależy w dużym stopniu od ich budowy. Bisfosfoniany proste, czyli niezawierające w swojej cząsteczce azotu, wnikają do komórki



Rycina 6. Reakcja syntezy analogu ATP z bisfosfonianu (pCp — bisfosfonian; pOp — pirofosforan; AppCp — bisfosfonianowy analog ATP; ATP — adenozynotrifosforan). Opracowanie własne na podstawie Rogers [13] i Rogers i wsp. [14]

Figure 6. Synthesis of bisphosphonate derived ATP analog (pCp — bisphosphonate; pOp — pyrophosphate; AppCp — ATP analog; ATP — adenosine triphosphate). Modified from Rogers [13] and Rogers et al. [14]

osteoklasta i są tam przekształcane do bardzo stabilnego, niepodlegającego hydrolizie, analogu adenozynotrifosforanu (ATP, adenosine triphosphate) — AppCp (ryc. 6). Ma to związek ze strukturalnym podobieństwem bisfosfonianów do cząsteczki pirofosforanu. Bisfosfonianowe analogi ATP gromadzą się w cytozolu osteoklastów i hamują działanie kilku ważnych dla resorpcyjnej aktywności oraz przeżywania osteoklastów enzymów, w tym translokazy nukleotydów adeninowych (ANT, adenine nucleotide translocase) [13, 14]. Enzym ten wchodzi w skład porów mitochondrialnych i przenosi adenozyndifosforan (ADP, adenosine diphosphate) do wnętrza, a ATP na zewnątrz mitochondrium [15]. Wymiana nukleotydów jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów osteoklasta [15], a zahamowanie jej poprzez AppCp prowadzi do apoptozy komórki [13, 14]. Obserwuje się zdarzenia typowe dla apoptozy, takie jak: zaburzenia potencjału błonowego mitochondriów, wpływ cytochromu c, aktywację kaspazy-3 — kluczowego enzymu apoptotycznego [13, 14]. Bisfosfoniany azotowe ze względu na wielkość cząsteczki nie są metabolizowane na terenie osteoklastów. Doprrowadzają do śmierci komórki osteoklasta na drodze inhibicji syntazy difosforanu farnezyli (FPP synthase, farnesyl diphosphate synthase) (ryc. 7). Jest to enzym szlaku mewalonowego, którego podstawową rolę jest produkcja cholesterolu i lipidów izoprenoidowych: difosforanu farnezyli (FPP, farnesyl diphosphate) i difosforanu geranylogeranyli (GGPP, geranylgeranyl diphosphate). Są to substraty dla syntezy ważnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki związków, na przykład dolicholu czy ubichinonu. FPP oraz GGPP są także donorami grup izoprenoidowych w procesie prenylacji białek. Modyfikacja ta jest niezbędna dla funkcjonowania GTPaz (tj. Ras, Rho Rac, Cdc42 czy Rab), ważnych przekazników sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Brak funkcji tych białek skutkuje zaburzeniami cytoszkieletu osteoklastów, formowania podosomu, fałdowania błony oraz ruchu pęcherzyków transportujących, co prowadzi do utraty aktywności resorpcyjnej osteoklastów i w konsekwencji do apoptozy komórki [13, 14]. Z drugiej strony, inhibicja syntazy FPP prowadzi do



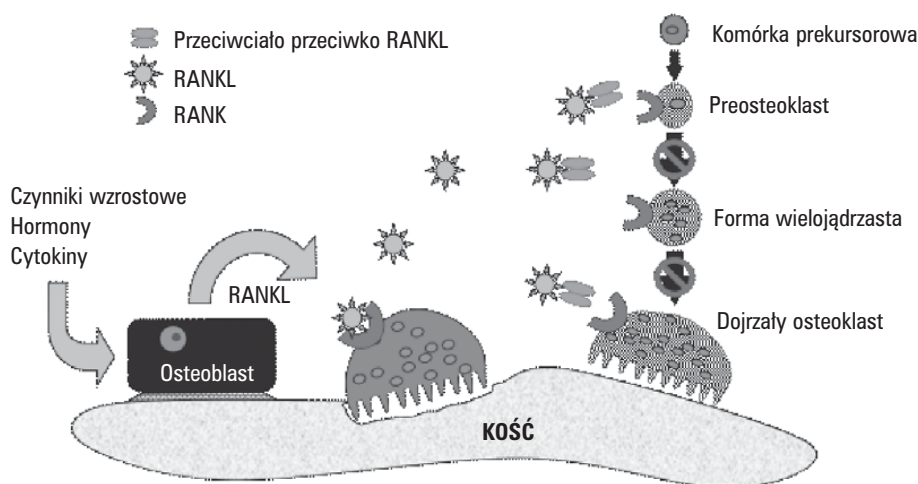
Rycina 7. Schemat szlaku mewalonowego. Opracowanie własne na podstawie Rogers [13] i Rogers i wsp. [14]

Figure 7. Mevalonate pathway scheme. Modified from Rogers [13] and Rogers et al. [14]

kumulacji difosforanu izopentenylu (IPP, isopentenyl diphosphate) (ryc. 7), który wchodzi w reakcję z ATP, wynikiem której jest bardzo stabilny produkt ApppI. ApppI prowadzi do apoptozy osteoklasta na drodze hamowania aktywności ANT [16]. Bisfosfoniany azotowe wykazują także zdolność do bezpośredniego hamowania aktywności V H⁺ATPazy zakwaszającej środowisko jamy resorpcyjnej, wielu metaloproteinaz, fosfataz, fosfohydrolaz biorących udział w degradacji macierzy kostnej oraz białkowych fosfataz tyrozynowych niezbędnych dla różnicowania i dojrzewania osteoklastów. Inhibicja tych enzymów prowadzi do utraty zdolności resorpcyjnych osteoklastów lub hamuje osteoklastogenezę [13, 14].

Przeciwciało przeciwko RANKL

Cytokina RANKL jest niezbędna dla różnicowania, dojrzewania, funkcjonowania i przeżywania osteoklastów. Jak wcześniej opisano, związanie RANKL z RANK determinuje prawidłową osteoklastogenezę, a także aktywność resorpcyjną osteoklastów i zapobiega przedwczesnej apoptozie dojrzałych komórek. Jednocześnie istnienie mechanizmów regulujących w postaci konkurencyjnego receptora OPG zapobiega nadmiernej resorpcji [17]. Fakt ten stał się podstawą dla opracowania preparatu antyosteoporotycznego — przeciwciała przeciwko RANKL — który podobnie jak OPG wiąże się z RANKL, zapobiegając jego wiązaniu się z RANK, i hamuje różnicowanie oraz funkcjonowanie dojrzałych osteoklastów [18] (ryc. 8). Podawanie rekombinowanej OPG niestety nie powiodło się ze względu na występowanie działań niepożądanych (łagodna hipokalcaemia i reakcja immunologiczna) [19].



Rycina 8. Mechanizm działania przeciwciała przeciwko RANKL. Opracowanie własne na podstawie Hofbauer i wsp. [17] i Rogers i wsp. [18]
Figure 8. Mechanism of action of anti-RANKL antibodies. Modified from Hofbauer et al. [17] and Rogers et al. [18]

Inhibitory katepsyny K

Katepsyna K jest proteinazą cysteinową produkowaną w dużych ilościach i praktycznie wyłącznie przez osteoklasty. Stanowi ona jeden z szerokiej gamy enzymów proteolitycznych uwalnianych do jamy resorpcyjnej [20]. Obecna jest ona także na terenie osteoklasta w lizosomach oraz pęcherzykach transcytotycznych. Katepsyna K degradowuje białka macierzy kostnej, w tym kolagen typu I, osteopontynę, osteonektynę. Ma ona zdolność cięcia cząsteczki kolagenowej zarówno w regionie telopeptydowym, jak i w obszarze potrójnej helisy [21]. Aktywność enzymatyczna katepsyny K jest kluczowa dla procesu resorpcji kostnej, o czym świadczy fakt, że mutacja w genie kodującym ten enzym skutkuje pyknodystozą — autosomalną recesywną chorobą objawiającą się hipoplazją twarzy, przedwczesnym zamknięciem nasad kości długich i w związku z tym niskorosłością, zwiększoną łamliwością kości, mimo podwyższonej gęstości mineralnej, oraz osteosklerozą kości długich [20]. W związku z powyższym zainteresowano się katepsyną K jako celem dla terapii osteoporozy. Zidentyfikowano wiele związków chemicznych będących odwracalnymi i selektywnymi inhibitorami katepsyny K. Są to związki niskocząsteczkowe zawierające grupę elektrofilową, która oddziałuje z nukleofilową cysteiną obecną w centrum aktywnym katepsyny K i blokuje jej działanie, co skutkuje obniżeniem aktywności resorpcyjnej osteoklasta [21].

Skuteczność terapeutyczna leków antykatabolicznych

Efektywność terapeutyczną leków stosowanych w osteoporozie mierzy się przede wszystkim obniżeniem często-

ści występowania złamańiskoenergetycznych (tab. I). W toku badań klinicznych zastosowano tak zwane markery zastępcze efektów klinicznych, czyli densytometryczny pomiar gęstości mineralnej kości (BMD, *bone mineral density*) oraz stężenia biochemicznych markerów metabolizmu kostnego.

Hormonalna terapia zastępcza

Obniża ona resorpcję kostną, blokując osteoklastogenezę oraz wpływając na aktywność resorpcyjną dojrzałego osteoklasta i kierując go na drogę apoptozy. Wyniki badań zarówno obserwacyjnych, jak i randomizowanych wskazują na skuteczność estrogenów w obniżaniu ryzyka złamań kręgow oraz innych kości (w tym bliższego końca kości udowej) o około 30% niezależnie od wyjściowej BMD. Zapobiegają utracie masy kostnej, niezależnie od wieku i czasu trwania terapii, we wszystkich miejscach szkieletu. Jednak po zakończeniu leczenia spadek masy kostnej wraca do poziomu obserwowanego po menopauzie, choć nie od razu, bo wpływ ochronny przed złamaniami może utrzymywać się przez kilka lat [22]. Ze względu na działania niepożądane, w tym najistotniejsze — wzrost ryzyka choroby wieńcowej i raka sutka oraz udaru mózgu [23], w większości krajów stosowanie HTZ ograniczono do okresu pomenopauzalnego ukierunkowane głównie na łagodzenie objawów menopauzy [22].

Selektywne modulatory receptora estrogenowego

Podobnie jak estrogeny obniżają one intensywność procesów resorpcyjnych na etapie osteoklastogenezy oraz funkcjonowania dojrzałego osteoklasta. Efektywność przeciwlamaniowa HTZ, a z drugiej strony jej działania niepożądane skłoniły do poszukiwań i badań

Tabela I. Podsumowanie skuteczności przeciwzłamaniowej preparatów antykatabolicznych

Table I. Antifracture efficacy of anticatabolic drugs

| Lek | Skuteczność przeciwzłamaniowa udowodniona w badaniach klinicznych | | |
|-------------|---|-----------------|---------------------|
| | Złamania kręgow | Złamania biodra | Złamania pozakręgow |
| HTZ | + | + | + |
| Raloksyfen | + | Brak dowodów | Brak dowodów |
| Alendronian | + | + | + |
| Ryzedronian | + | + | + |
| Ibandronian | + | Brak dowodów | Brak dowodów |
| Zoledronian | + | + | + |
| Denosumab | Brak dowodów | Brak dowodów | Brak dowodów |
| Odanakatib | Brak dowodów | Brak dowodów | Brak dowodów |
| Balikatib | Brak dowodów | Brak dowodów | Brak dowodów |

HTZ — hormonalna terapia zastępcza

nad lekami naśladującymi działanie estrogenów, ale bez efektów ubocznych. Spośród dużej liczby związków z grupy SERM, raloksyfen jest jedynym obecnie dostępnym i zarejestrowanym do stosowania w osteoporozie, chociaż kilka innych leków znajduje się w fazie badań klinicznych [22]. Raloksyfen zmniejsza ryzyko złamań kręgow u kobiet po menopauzie o niskiej masie kostnej lub z osteoporozą według kryteriów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) ($T\text{-score} < -2,5\text{ SD}$) ze złamaniami lub bez o 30–50% (badanie MORE [*Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation*]). Nie wykazano znamiennej redukcji częstości złamań pozakręgowych, za wyjątkiem obniżenia ryzyka złamań innych niż złamania kręgow u kobiet z największym ryzykiem złamań, to jest po przebytym ciężkim złamaniu kręgow (analiza *post-hoc*) [22]. Ważne jest, że nie obserwowano działań niepożądanych takich jak w przypadku stosowania HTZ, a wręcz wykazano znamienne i trwałą redukcję ryzyka raka sutka (o ok. 60%) [22].

Bisfosfoniany

Leki z grupy bisfosfonianów działają na dojrzałego osteoklasta, prowadząc do jego apoptozy, choć badania *in vitro* wykazują zdolność bisfosfonianów do inhibicji enzymów niezbędnych do różnicowania się osteoklastów. Spośród szerokiej gamy związków z grupy bisfosfonianów zarejestrowanych w Polsce jest kilka: alendronian, ryzedronian oraz ibandronian. Alendronian zmniejsza ryzyko złamań kręgow, kości nadgarstka oraz bliższego końca kości udowej o 50% u kobiet z przebytym wcześniej złamaniem kręgu (badanie FIT [*Fracture Intervention Trial*]). Ponadto zaobserwowano znamienne obniżenie częstości złamań kręgow u kobiet bez wcześniejszych złamań, u których rozpoznano osteopo-

rozę według kryteriów WHO w lokalizacji bliższego końca kości udowej [22]. Dowiedziono także skuteczności przeciwzłamaniowej ryzedronianu u kobiet z przebytymi złamaniami kręgow (redukcja ryzyka złamań o 40–50% dla lokalizacji kręgosłupa oraz o 30–36% dla lokalizacji pozakręgowych) [22]. U kobiet w podeszłym wieku ryzedronian obniżał częstość złamań bliższego końca kości udowej o 30%, przy czym efekt ten był największy dla przedziału wiekowego kobiet 70–79 lat z osteoporozą według kryteriów WHO, natomiast powyżej 80. roku życia stawał się nieznamienne statystycznie dla kobiet bez cech osteoporozy [22]. Ibandronian zmniejsza ryzyko złamań kręgow o 50–60%. Dla lokalizacji pozakręgowych skuteczność przeciwzłamaniową wykazano w analizie *post-hoc* u kobiet z $T\text{-score}$ mniejszym niż $-3,0$ odchylenia standardowego (SD, *standard deviation*). Dla ibandronianu badano również wpływ schematu podawania raz w miesiącu doustnie lub raz na 3 miesiące dożylnie, wykazując podobną skuteczność działania leku przez porównanie wzrostu wartości BMD oraz obniżenia stężenia markerów obrotu kostnego [22]. Zakończono także badania III fazy nad skutecznością terapeutyczną zoledronianu. Lek ten podawany dożylnie raz do roku budzi ogromne nadzieje wysoką efektywnością przeciwzłamaniową (obniżenie o 70% częstości złamań kręgow oraz o 40% złamań innych kości) [22].

Przeciwciała przeciwko RANKL

W III fazie badań znajduje się ludzkie monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko RANKL nazwane denosumab. Lek ten skutecznie hamuje osteoklastogenezę oraz obniża aktywność resorpcyjną dojrzałego osteoklasta, co skutkuje obniżeniem resorpcji kostnej. Brakuje jednak danych na temat obniżania częstości

Tabela II. Porównanie mechanizmów działania preparatów antykatabolicznych stosowanych w leczeniu osteoporozy lub będących w trakcie badań**Table II. Comparison of mechanisms of action of anticatabolic drugs that are approved for the treatment of osteoporosis or currently under evaluation**

| Grupa leków | Mechanizm działania |
|---------------------------------------|--|
| HTZ/SERM | Agonistyczne działanie względem receptorów estrogenowych → hamowanie osteoklastogenezy i aktywności resorpcyjnej osteoklastów, efekt proapoptotyczny |
| Bisfosfoniany: Proste Azotowe | Cytotoksyczne działanie bisfosfonianowych analogów ATP → indukcja apoptozy osteoklastów Blokowanie izoprenylacji GTPaz → indukcja apoptozy osteoklastów |
| Przeciwciało przeciwko RANKL | Blokowanie oddziaływania RANK–RANKL → hamowanie osteoklastogenezy i aktywności resorpcyjnej osteoklastów, efekt proapoptotyczny |
| Inhibitory katepsyny K | Inhibicja katepsyny K → hamowanie funkcjonowania osteoklastów |
| Inhibitory H ⁺ ATPazy | Inhibicja pompy protonowej ATP-zależnej → hamowanie aktywności resorpcyjnej osteoklastów |
| Antagoniści integryny $\alpha\beta_3$ | Blokowanie adhezji osteoklastów do kości → hamowanie aktywności resorpcyjnej osteoklastów |

złamań, ale w II fazie badań klinicznych zaobserwowano u kobiet po menopauzie z niskimi wyjściowymi wartościami BMD znamienne statystycznie spadek markerów resorpcji kostnej oraz wzrost BMD w lokalizacji kręgow, biodra oraz 1/3 przedramienia w stosunku do grupy otrzymującej placebo po 12 miesiącach [24] oraz dodatkowo około 2-krotnie wyższy wzrost BMD po 48 miesiącach terapii [25]. Jednocześnie badanie porównujące efekty kliniczne denosumabu i alendronianu wykazało znamienne większy wzrost BMD w każdej badanej lokalizacji (kręgosłup, biodro, 1/3 przedramienia) w grupie przyjmującej denosumab przez 24 miesiące [26].

Inhibitory katepsyny K

Ze względu na selektywność związków z grupy inhibitorów katepsyny K, leki te skutecznie hamują aktywność resorpcyjną dojrzałego osteoklasta, nie wpływając na jego różnicowanie oraz na aktywność innych komórek kostnych. Podobnie jak w przypadku denosumabu, w III fazie badań znajduje się odanakatib — selektywny i odwracalny inhibitor katepsyny K. W II fazie 12-miesięcznych badań klinicznych wykazano antykataboliczną skuteczność odanakatibu wyrażoną znamienym wzrostem BMD oraz obniżeniem markerów resorpcji kostnej u kobiet po menopauzie z niskimi wyjściowymi wartościami BMD [27]. W II fazie badań klinicznych znajduje się także kolejny inhibitor katepsyny K — balikatib. Wykazano dla niego wzrost BMD w lokalizacji kręgow oraz biodra oraz znamienne spadek stężenia markerów resorpcji kostnej (ale nie markerów kościotworzenia) u kobiet po menopauzie, po 12 miesiącach terapii [28]. Brakuje nadal danych dotyczących skuteczności przeciwzłamaniowej zarówno dla odanakatibu, jak i balikatibu.

Podsumowanie i perspektywy

Efektywność działania leków antykatabolicznych jest różna, co może wynikać z różnic w mechanizmie ich działania. Chociaż wspólną cechą wszystkich omówionych preparatów jest działanie antyresorpcyjne, gdzie celem jest osteoklast, to blokowanie jego funkcjonowania odbywa się na różnych etapach (tab. II). Leki blokujące osteoklastogenezę to głównie denosumab, ale także HTZ, SERM. Najbardziej selektywnym w stosunku do procesu resorpcji kostnej wydają się mechanizmy działania inhibitorów katepsyny K, które obniżają resorpcję, nie wpływając na proces kościotworzenia. Katepsyna K jest enzymem charakterystycznym w zasadzie wyłącznie dla osteoklastów, a hamowanie aktywności resorpcyjnej dojrzałego osteoklasta poprzez inhibicję jednego z enzymów proteolitycznych nie powinno wpływać na jego inne funkcje. Najczęściej stosowaną grupą leków w leczeniu osteoporozy są bisfosfoniany. O ich właściwościach fizykochemicznych i biologicznych decyduje budowa chemiczna, a konkretniej budowa łańcuchów bocznych. Ze względu na swoje ogromne powinowactwo do minerału kostnego charakteryzują się wysoką selektywnością w stosunku do tkanki kostnej. Związki te wbudowują się w kość i pozostają tam przez wiele lat, a w trakcie resorpcji kostnej są stopniowo uwalniane. W związku z powyższym stało się możliwe podawanie bisfosfonianów w dłuższych odstępach czasowych, a także w schemacie przerywanym.

Coraz większa wiedza na temat procesu resorpcji oraz powstawania i funkcjonowania osteoklastów otwiera nowe pola dla pomysłów na terapie antykataboliczne. Następnym po katepsynie K punktem zainteresowania stały się integryny. Pojawiły się próby sto-

sowania antagonistów integryny $\alpha_v\beta_3$. Receptory dla integryny $\alpha_v\beta_3$ obecne są między innymi w osteoklastach i odgrywają jeszcze dość niejasną rolę w funkcjonowaniu tych komórek kostnych. Podawanie szczyrom antagonistów integryny $\alpha_v\beta_3$ wiążących się z nią (echistatyna, kistryna, niskocząsteczkowe związki zawierające sekwencje RGD) obniżało resorpcję kostną stymulowaną PTH lub niedoborem estrogenów [29]. Podjęto podobne próby na niewielkiej grupie kobiet z małą masą kostną. To eksperymentalne leczenie skutkowało znaczącym wzrostem BMD w lokalizacji kręgosłupa oraz obniżeniem stężenia markerów resorpcji i kościotworzenia [30]. Obecnie prowadzone są także badania nad hamowaniem aktywności innych enzymów lub kanałów niezbędnych dla resorpcyjnej aktywności osteoklasta, w tym $V H^+ATP$ azy oraz CIC-7 [31, 32]. Powyższe próby i badania staną się być może podstawą do opracowania nowej grupy leków, bardzo selektywnych w stosunku do procesu resorpcji kostnej, które będzie można nazwać antyresorpcyjnymi w odróżnieniu od preparatów antykatabolicznych wpływających zarówno na resorpcję, jak i na kościotworzenie.

Piśmiennictwo

- Seeman E, Delmas PD. Bone quality — the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 2006; 354: 2250–2261.
- Pogoda P, Priemel M, Rueger JM i wsp. Bone remodeling: new aspects of a key process that controls skeletal maintenance and repair. *Osteoporos Int* 2005; 16: S18–S24.
- Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis — current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008; 8: 204–216.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504–1508.
- Tolar J, Teitelbaum SL, Orchard PJ. Osteopetrosis. *N Engl J Med* 2004; 351: 2839–2849.
- Datta HK, Ng WF, Walker JA i wsp. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008; 61: 577–587.
- Väänänen KH, Zhao H, Mulari M i wsp. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000; 113: 377–381.
- Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 2007; 13: 791–801.
- Stepan JJ, Alenfeld F, Boivin G i wsp. Mechanism of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Regul* 2003; 37: 227–240.
- Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic action on target genes. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 833–842.
- Rickard DJ, Subramaniam M, Spelsberg TC. Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. *J Cell Biochem Suppl* 1999; 32/33: 123–132.
- Zallone A. Direct and indirect estrogen action on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 173–179.
- Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2643–2658.
- Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 1999; 24: S73–S79.
- Stryer L. *Biochemia*. Przekład zbiorowy pod redakcją Augustyniaka JJ, Michejdy J z czwartego wydania amerykańskiego. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000.
- Mönkkönen J. Mechanism of action of bisphosphonates (abstrakt). *Bone* 2006; 39: S10.
- Hofbauer LC, Schoppert M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004; 292: 490–495.
- Rogers A, Eastell R. Review: Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor κ B ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6323–6331.
- Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A i wsp. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 348–360.
- Yamashita DS, Dodds RA. Cathepsin K and the design of inhibitors of cathepsin K. *Curr Pharm Des* 2000; 6: 1–24.
- Rodan SB, Duong LT. Cathepsin K — a new molecular target for osteoporosis. *IBMS BoneKey* 2008; 5: 16–24.
- Kanis JA, Burlet N, Cooper C i wsp. European guidance for diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2008; 19: 399–428.
- Roussow JE, Anderson GL, Prentice RL i wsp. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 321–333.
- McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB i wsp. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2006; 354: 821–831.
- Miller P, Bolognese MA, Lewiecki EM i wsp. Effect of denosumab on bone mineral density and bone turnover markers: 48-month results. *J Bone Miner Res* 2007; 22 (Supl. 1): S58.
- Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK i wsp. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2149–2157.
- Bone HG, McClung M, Verbruggen N i wsp. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of a cathepsin-K inhibitor in the treatment of postmenopausal women with low BMD: one year results. *J Bone Miner Res* 2007; 22 (supl. 1): S37.
- Adami S, Supronik J, Hala T i wsp. Effect of one year treatment with the cathepsin-K inhibitor, balicatib, on bone mineral density (BMD) in postmenopausal women with osteopenia/osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2006; 21 (supl. 1): S24.
- Coleman PJ, Brashear KM, Askew BC i wsp. Nonpeptide alphavbeta3 antagonists. Part 11: discovery and preclinical evaluation of potent alphavbeta3 antagonists for the prevention and treatment of osteoporosis. *J Med Chem* 2004; 47: 4829–4837.
- Murphy MG, Cerchio K, Stoch SA i wsp. Effect of L-000845704, an $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonist, on markers of bone turnover and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2022–2028.
- Visentin L, Dodds RA, Valente M i wsp. A selective inhibitor of the osteoclastic V-H(+)-ATPase prevents bone loss in both thyroparathyroidectomized and ovariectomized rats. *J Clin Invest* 2000; 106: 309–318.
- Schaller S, Henriksen S, Sørensen MG i wsp. The role of chloride channels in osteoclasts: CIC-7 as a target for osteoporosis treatment. *Drug News Perspect* 2005; 18: 489–495.