

11. Bisfosfonati e metabolismo lipidico *Up-to-date 2005*

Carmelo Erio Fiore, Pietra Pennisi
Clinica Medica OVE, Università di Catania

Introduzione

Negli ultimi anni sono stati ottenuti notevoli progressi nella conoscenza dell'attività farmacologica dei bisfosfonati (BF), in particolare di quelli contenenti un gruppo aminico e definiti pertanto amino-bisfosfonati (N-BF). È stato tra l'altro evidenziato che target di queste sostanze non sono solo gli osteoclasti, ma anche osteoblasti, osteociti, cellule macrofagiche e i linfociti T gammadelta.

Recentemente è stato identificato il meccanismo d'azione degli N-BF, il cui target molecolare è un enzima chiave della via del mevalonato, la farnesil pirofosfato sintetasi [1]. L'inibizione di questo enzima da parte degli N-BF compromette la sintesi delle proteine regolatrici Rac, Rho e Cdc42, che controllano l'attività pro-riassorbitiva degli osteoclasti.

Poiché l'inibizione del suddetto enzima provoca anche la soppressione della sintesi di colesterolo [2], è possibile che gli N-BF riducano l'attività e la sopravvivenza delle cellule target (osteoclasti) anche mediante un intervento sul colesterolo della parete cellulare e quindi sulla fluidità di membrana. L'interferenza con la sintesi di colesterolo, una caratteristica non posseduta dai BF che non contengono gruppi aminici, quali etidronato e clodronato, sembra influenzare anche il metabolismo lipidico in generale. È stato osservato [3], infatti, che neridronato, un potente N-BF di recente sintesi, somministrato per via venosa incrementa la concentrazione plasmatica di HDL colesterolo e riduce quella di LDL colesterolo in donne affette da osteoporosi post-menopausale.

La spiegazione di tale effetto non è semplice. Se da un lato la somministrazione parenterale sembra essere indispensabile per ottenere una modificazione del rapporto HDL-C/LDL-C, suggerendo un accumulo epatico dell'N-BF e quindi un blocco della via del mevalonato anche nell'epatocita (al pari di quanto avviene per le statine, ma in misura ovviamente inferiore), dall'altro la durata dell'effetto, prolungata nel tempo, fa ritenere che la modificazione del profilo lipidico possa essere mantenuta da un incremento stabile del numero dei recettori per le LDL sull'epatocita [4]. Un effetto simile sul profilo lipidico è stato osservato pure per pamidronato [5].

Un'altra possibile modalità di intervento è quella evidenziata da Strobach e coll. su colture cellulari [6]. L'Autore ha dimostrato che ibandronato riduce la concentrazione cellulare di colesterolo nei monociti nonostante sia evidente una iperattivazione reattiva del recettore per le LDL. La spiegazione può risiedere nel fatto che ibandronato incrementa l'efflusso di colesterolo HDL dalla cellula tramite stimolazione trascrizionale dell'exporter ABCA1.

Queste osservazioni sono rilevanti non tanto per la prospettiva di utilizzare gli N-BF come ipocolesterolemizzanti (la riduzione del colesterolo è comunque modesta e inferiore a quella ottenibile con le statine), ma per l'interessante possibilità di poter modificare nei pazienti trattati la tendenza all'iperossidazione di lipidi e lipoproteine, che conduce sia al progressivo accumulo di tali prodotti nel tessuto scheletrico sia alla proliferazione di cellule schiumose saturate di lipidi nella parete arteriosa.

Pamidronato, ibandronato, risedronato, zoledronato e clodronato (quest'ultimo non interferisce direttamente con la sintesi del colesterolo) inibiscono *in vitro* la perossidazione dei lipidi microsomiali, svolgendo una spiccata attività antiossidante e di scavenger di radicali idrossilici, dovuta verosimilmente alla comune caratteristica strutturale di sostanze chelanti il ferro [7].

Questa proprietà apre interessanti prospettive nel campo delle malattie reumatiche, in quanto l'inibizione della perossidazione lipidica nei condrociti può ridurre la degradazione del collagene articolare [8].

L'azione dei BF sul metabolismo lipidico appare complessa e articolata, non strettamente dipendente dall'inibizione della sintesi di colesterolo, e potrebbe rallentare la progressione dell'aterosclerosi nei pazienti trattati.

Rassegna bibliografica

■ Efficacia di pamidronato sul profilo lipidico in pazienti con malattia ossea di Paget

Nel trial longitudinale eseguito da Montagnani e coll. [5] sono stati studiati gli effetti di un amino-bisfosfonato (pamidronato) somministrato ev sui livelli di colesterolo totale, sulle frazioni HDL - LDL e sui trigliceridi, in un gruppo di pazienti affetti da malattia di Paget. Questa patologia si caratterizza per un intenso turnover osseo; i bisfosfonati, grazie al meccanismo d'azione di riduzione della frequenza di attivazione delle unità di rimodellamento osseo, rappresentano la prima scelta terapeutica per il trattamento della malattia di Paget.

Sono stati studiati 20 pazienti (8 donne in post-menopausa e 12 uomini) affetti da malattia di Paget poliostotica in fase attiva, non sottoposti a terapia con farmaci anti-riassorbitivi nei 2 mesi precedenti. I pazienti hanno ricevuto tre cicli di trattamento con pamidronato 30 mg ev in 2 giorni consecutivi. Tale ciclo veniva ripetuto ogni 3 mesi nell'arco di un anno, per un dosaggio totale di 180 mg di pamidronato. Il gruppo controllo era costituito da 12 pazienti con malattia di Paget, nei quali un buon controllo della malattia era stato ottenuto grazie a precedenti terapie. I due gruppi erano comparabili dal punto di vista del metabolismo lipidico. Il colesterolo totale, i trigliceridi, le lipoproteine ad alta e bassa densità (HDL e LDL) e i marker di formazione ossea (isoenzima osseo della fosfatasi alcalina totale) sono stati dosati prima della somministrazione del farmaco, al tempo basale, e successivamente a 3, 6, 9 mesi. L'efficacia del trattamento con pamidronato si evidenziava già al 3° mese, come mostrato dalla riduzione dei valori della fosfatasi alcalina totale e del suo isoenzima osseo.

Nel gruppo trattato i livelli sierici di HDL aumentavano significativamente già al 6° mese e al 9° mese di trattamento rispetto ai valori basali (+5,0% e +10,0%, rispettivamente); contemporaneamente i livelli di LDL si riducevano in modo statisticamente significativo al nono

mese (-5,5%). L'indice HDL/LDL mostrava un incremento progressivo per tutta la durata dello studio, così come l'indice colesterolo totale/HDL si riduceva rispetto ai valori basali. Nessuna variazione si è osservata invece a carico dei trigliceridi, mentre i valori di colesterolo totale diminuivano ma senza raggiungere una significatività statistica. Nel gruppo controllo nessuna variazione si è avuta a carico degli stessi parametri biochimici. Nei due gruppi si evidenziava, quindi, una differenza significativa per i livelli di HDL (più elevati nel gruppo trattato al 3°, 6° e 9° mese), e per i livelli di LDL (maggiormente ridotti sempre nel gruppo trattato al 6° e 9° mese). Gli indici HDL/LDL e colesterolo totale/HDL inoltre differivano in modo significativo tra i due gruppi come mostrato nella Tabella 1.

Tabella 1. Variazioni dei lipidi sierici in pazienti pagetici trattati con pamidronato ev. Valori basali durante il follow-up

	Terapia	Basale	3 mesi	6 mesi	9 mesi
Col. totale (mg/dl)	Pamidronato	190,1±35,5	185,9±33,6	185,5±39,1	184,4±32,9
	Controlli	188,5±40,2	188,5±40,2	186,8±40,5	185,6±38,4
LDL (mg/dl)	Pamidronato	118,3±35,9	117,2±33,3	113,6±34,4 ^{ac}	111,7±33,9 ^{ac}
	Controlli	117,1±32,8	116,3±38,4	117,8±31,7	114,6±39,4
Trigliceridi (mg/dl)	Pamidronato	140,0±45,1	117,8±39,7	129,5±45,6	123,5±58,5
	Controlli	133,3±43,8	131,6±40,8	127,5±44,9	134,5±46,7
HDL (mg/dl)	Pamidronato	43,8±12,3	45,1±11,5 ^{ac}	46,0±11,9 ^{ac}	48,3±12,0 ^{ac}
	Controlli	44,6±10,7	43,8±11,2	43,5±10,9	44,1±10,8
Col. totale/HDL	Pamidronato	4,36±0,11	4,13±0,10 ^{ac}	4,00±0,11 ^{ac}	3,81±0,09 ^{bd}
	Controlli	4,22±0,13	4,26±0,11	4,29±0,15	4,20±0,10
HDL/LDL	Pamidronato	0,37±0,15	0,38±0,13	0,40±0,15 ^{ac}	0,43±0,12
	Controlli	0,36±0,11	0,37±0,12	0,37±0,13	0,38±0,12

^ap<0,05; ^bp<0,01 vs. basale; ^cp<0,05; ^dp<0,01 tra i due gruppi

Commento

I risultati di questo lavoro concordano con quelli ottenuti con un altro potente bisfosfonato (neridronato) in un trial condotto per il trattamento dell'osteoporosi postmenopausale [3]. In entrambi gli studi la somministrazione endovena del farmaco ha consentito di superare la problematica legata all'assorbimento stesso dei BF permettendo al farmaco di raggiungere una buona concentrazione, non solo sul tessuto osseo, ma anche in altri tessuti quali fegato e milza. Questo modello si rivela quindi ottimale per lo studio dei potenziali effetti dei BF sulla modificazione della sintesi del colesterolo. Un possibile meccanismo ipotizzato dagli Autori per spiegare la riduzione dei livelli di LDL e l'incremento delle HDL è legato alla capacità degli amino-bisfosfonati di inibire l'attività dell'enzima farnesil pirofosfato sintetasi (coinvolto nella cascata del mevalonato) non solo negli osteoclasti, ma anche negli epatociti. La riduzione ottenuta a carico delle LDL non si traduce tuttavia in un'altrettanto evidente riduzione del colesterolo totale. La riduzione dei livelli di LDL risulta inferiore a quella che si ottiene con altre terapie (statine, terapia ormonale sostitutiva). Inoltre, tale azione è stata osservata utilizzando dosaggi elevati di pamidronato per via endovena (60 mg ogni 3 mesi). Non

sono stati riportati ancora risultati con altri bisfosfonati somministrati per via orale e utilizzati ai dosaggi comunemente impiegati nella terapia dell'osteoporosi post-menopausale. È ipotizzabile, quindi, che tali effetti sul metabolismo lipidico si possano spiegare solo grazie al raggiungimento di una concentrazione efficace dei BF negli epatociti, tale da permettere l'inibizione degli enzimi coinvolti nella sintesi del colesterolo. Tuttavia, i risultati di questo studio sono incoraggianti e rilevanti dal punto di vista clinico per gli effetti positivi ottenuti sul metabolismo lipidico dalla somministrazione dei BF. La riduzione dell'indice colesterolo totale/HDL, e contemporaneamente l'incremento dell'indice HDL/LDL, determinando un miglioramento dell'indice del rischio aterosclerotico, potrebbe rilevare utile in quei pazienti nei quali coesistono patologia ossea e malattia cardiovascolare.

■ Azione antiossidante *in vitro* dei bisfosfonati

Sulla base di alcuni effetti biologici dei BF evidenziati recentemente, quali l'attività anti-infiammatoria [9], la protezione dei condrociti dall'apoptosi indotta dai glucocorticoidi [10], la prevenzione dell'apoptosi di osteoblasti e di osteociti [11], Dombrecht e coll. [7] hanno indagato ulteriori possibili azioni dei BF su differenti tipi cellulari. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare il profilo antiossidante, non ancora ben studiato, di alcuni bisfosfonati.

In tre modelli sperimentali, gli Autori, tenendo in considerazione le differenti strutture dei BF, ne analizzano le proprietà antiossidanti *in vitro*: capacità di inibire la xantina ossidasi, capacità di inibizione della perossidazione lipidica, capacità di inibire la produzione di radicali liberi. I BF studiati sono stati pamidronato, risedronato, ibandronato, zoledronato (BF che contengono un gruppo aminico) e clodronato (BF non-aminico).

Nessuno dei BF studiati si è rivelato in grado di inibire l'attività della xantina ossidasi nel primo modello; l'attività di antiperossidazione lipidica, espressa per ciascuna molecola come concentrazione in $\mu\text{mol/l}$ capace di inibire al 50% la reazione del sistema, è stata invece osservata per tutti i BF presi in esame (Tabella 2). Il Trolox, forte antiossidante, è stato utilizzato come controllo positivo. In questo secondo modello di reazione il pirofosfato ha mostrato una capacità inibitoria sul sistema meno efficace rispetto ai BF.

Tabella 2. Attività di inibizione della perossidazione lipidica microsomiale svolta da differenti bisfosfonati e dal pirofosfato. Il Trolox è un potente antiossidante usato come controllo positivo

Molecola	Perossidazione lipidica IC ₅₀ ±DS ($\mu\text{mol/l}$)
Clodronato	3,63±0,05
Pamidronato	0,73±0,02
Ibandronato	1,54±0,04
Risedronato	2,01±0,06
Zoledronato	1,05±0,06
Pirofosfato	9,41±0,18
Trolox	2,80±0,20

L'inibizione della produzione di radicali liberi (terzo modello) è stata valutata solo per clodronato e risedronato, per i quali è stata osservata una capacità di inibizione del 55% e dell'80% rispettivamente.

Commento

I sistemi antiossidanti si riducono con l'età, con conseguente incremento dei livelli di radicali liberi e dei livelli sierici di lipidi e lipoproteine suscettibili all'ossidazione. I radicali liberi dell'ossigeno giocano, inoltre, un ruolo importante nei processi infiammatori in generale e contribuiscono in modo particolare ai processi infiammatori caratteristici dell'artrite reumatoide e alla distruzione della cartilagine [12].

I BF studiati non hanno mostrato attività di inibizione sull'enzima xantinossidasi. Un'attività di inibizione è stata osservata invece a carico della perossidazione lipidica. Sembra, quindi, che i BF possano svolgere un ruolo potenziale nella prevenzione del processo aterosclerotico, contrastando i processi di perossidazione lipidica e inibendo la produzione di radicali liberi da parte dei neutrofili e dei macrofagi. Uno dei meccanismi responsabili della formazione dei radicali idrossilici nei processi infiammatori articolari è la reazione dell'idrogeno perossido con il ferro. Questa reazione conduce alla perossidazione lipidica e al conseguente danno tissutale [13]. Diversi dati suggeriscono che il ferro partecipi ai processi infiammatori locali e svolga un ruolo importante nella patogenesi del danno articolare. L'attività di inibizione della perossidazione lipidica sembra spiegata in parte dall'affinità dei BF per i cationi bivalenti e in modo particolare per il ferro. I chelanti del ferro, quindi, riducendo la quantità di metallo disponibile per tali reazioni, potrebbero avere un ruolo protettivo in questi processi [14].

Questi dati preliminari necessitano di ulteriori studi per verificare l'azione dei BF come potenziali chelanti del ferro e prospettare un eventuale utilizzo terapeutico in patologie caratterizzate dalla presenza di processi infiammatori, inclusa l'aterosclerosi.

■ Ibandronato e contenuto cellulare di colesterolo

Le cellule chiave coinvolte nel processo aterosclerotico sono i monociti e i macrofagi. Recenti osservazioni hanno evidenziato in modelli animali che il trattamento con BF provoca una riduzione delle lesioni aterosclerotiche [15]. In un recente lavoro Strobach e coll. [6] hanno studiato il meccanismo d'azione e gli effetti metabolici prodotti dall'amminobisfosfonato ibandronato su colture cellulari di monociti/macrofagi.

Culture cellulari della linea monocitaria (MM6) sono state incubate per 48 ore in presenza di ibandronato a concentrazioni crescenti da 0,8 a 100 nM. A concentrazioni di 4 nM di ibandronato si è osservata una riduzione superiore al 30% del contenuto cellulare di colesterolo. Concentrazioni superiori del BF e fino a 100 nM non modificavano ulteriormente il contenuto intracellulare di colesterolo (Figura 1). Tale riduzione si accompagnava a un incremento del transporter per il colesterolo (ABCA1). L'aumentata espressione di tale carrier sotto l'effetto dell'azione del BF si manteneva anche dopo la completa deplezione intracellulare di colesterolo. Il meccanismo ipotizzato coinvolge l'inibizione della prenilazione della proteina GGPP (coinvolta nella regolazione dell'espressio-

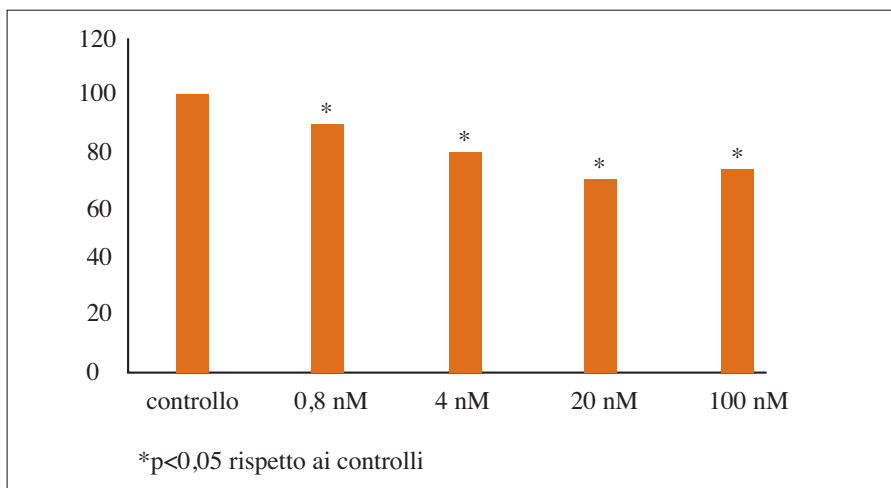


Figura 1. Effetti di ibandronato sul contenuto di colesterolo intra-cellulare di monociti-macrofagi (percentuale in confronto al contenuto di colesterolo delle cellule incubate con solo carrier).

ne del transporter del colesterolo). È stato inoltre osservato che ibandronato, attraverso una riduzione dell'espressione dei recettori per le LDL, inibiva l'incremento intracellulare di colesterolo ottenuto incubando le cellule con LDL ossidate e LDL acetilate.

Commento

Lo studio evidenzia uno dei possibili meccanismi d'azione attraverso cui i BF sarebbero capaci di interferire con il metabolismo lipidico. La riduzione del colesterolo intracellulare osservata nello studio sembra dovuta non solo a una riduzione della sintesi, ma anche a un aumentato trasporto del colesterolo stesso verso l'esterno della cellula. Tale effetto si esplica attraverso un maggiore incremento dell'espressione dell'ABCA1 (transporter del colesterolo), che si osserva sotto l'azione di ibandronato.

Il dato originale di questo esperimento è, inoltre, una riduzione dell'uptake cellulare delle LDL acetilate e ossidate, ottenuta sotto l'effetto di basse dosi di ibandronato. Le concentrazioni di bisfosfonato utilizzate in questo esperimento, ed efficaci nel produrre l'effetto metabolico sulle cellule monocitarie, erano infatti dell'ordine di 4 nM, simili a quelle che si ottengono con le dosi di BF somministrate per gli usi terapeutici [16]. Sembra pertanto che le interazioni dei BF con il metabolismo lipidico, e in modo particolare con le lipoproteine circolanti, possano svolgersi a diversi livelli (epatociti, monociti, macrofagi); in modo particolare, il meccanismo d'azione osservato in questo studio sembra essere specifico per i monociti e i macrofagi. L'interesse clinico è evidente, in quanto gli effetti dei bisfosfonati sulla parete vasale sembrano essere più rilevanti di quelli svolti sull'epatocita.

Bibliografia

1. Van Beek E et al (1999) Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun* 264:108-111
2. Amin D et al (1992) Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase

- and cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res* 33:1657-1663
3. Adami S et al (2000) Chronic intravenous aminobisphosphonate therapy increases high-density lipoprotein cholesterol and decreases low-density lipoprotein cholesterol. *J Bone Miner Res* 15:599-604
 4. Berkhout TA et al (1996) The novel cholesterol-lowering drug SR-12813 inhibits cholesterol via an increased degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem* 271:14376-14382
 5. Montagnani A et al (2003) Changes in serum HDL and LDL cholesterol in patients with Paget's bone disease treated with pamidronate. *Bone* 32:15-19
 6. Strobach D et al (2003) The bisphosphonate ibandronate stimulates reverse cholesterol transport out of monocytoïd cells by enhanced ABCA1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 307:23-30
 7. Dombrecht EJ et al (2004) Selective *in vitro* antioxidant properties of bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun* 314:675-680
 8. Tiku ML et al (2000) Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem* 275:20069-20076
 9. Dunn CJ et al (1993) Demonstration of novel anti-arthritis and anti-inflammatory effects of diphosphonates. 266:1691-1698
 10. Plotkin LI et al (1999) Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104:1363-1374
 11. Bax BE et al (1992) Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 183:1153-1158
 12. Van Offel JF et al (2002) Effect of bisphosphonates on viability, proliferation, and dexamethasone-induced apoptosis of articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 61:925-928
 13. Dabbagh AJ et al (1993) Iron in joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 52: 67-73
 14. Naughton DP (2001) Iron (III)-mediated intra-articular crystal deposition in arthritis: a therapeutic role for iron chelators. *Med Hypotheses* 57:120-122
 15. Price PA et al (2001) Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:817-824
 16. Ravn P et al (2002) Association between pharmacokinetics of oral ibandronate and clinical response in bone mass and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone* 30: 320-324