

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE, FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA

Progetto Formativo 2: “FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA”

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 05/G1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/14

MOLECOLE BIOATTIVE NATURALI E SINTETICHE
PER LA TERAPIA DI MALATTIE DA AUMENTATO
RIASSORBIMENTO OSSEO

Presentata da: GEMMA DI POMPO

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. Giorgio Cantelli-Forti

Relatore

Chiar.mo Prof. Ferruccio Poli

Correlatori

Chiar.mo Prof. Nicola Baldini
Dott.ssa Donatella Granchi

Esame finale anno 2013

| | |
|---|-----------|
| INTRODUZIONE | 4 |
| IL TESSUTO OSSEO | 4 |
| <i>Cellule del tessuto osseo</i> | 6 |
| <i>Ossificazione e sviluppo del tessuto osseo</i> | 11 |
| <i>Omeostasi scheletrica</i> | 15 |
| <i>Modellamento e rimodellamento dell'osso</i> | 16 |
| <i>Osteoclasti e riassorbimento osseo</i> | 19 |
| FISIOPATOLOGIA DEL RIMODELLAMENTO OSSEO | 22 |
| <i>Osteoporosi</i> | 22 |
| Epidemiologia | 22 |
| Classificazione | 23 |
| Fattori di rischio | 23 |
| Diagnosi | 25 |
| Prevenzione e trattamento farmacologico | 25 |
| OBIETTIVO DELLO STUDIO..... | 28 |
| I. STUDIO DI MOLECOLE BIOATTIVE NATURALI PER LA TERAPIA DI MALATTIE DA AUMENTATO RIASSORBIMENTO OSSEO..... | 28 |
| II. STUDIO DI MOLECOLE BIOATTIVE SINTETICHE PER LA TERAPIA DI MALATTIE DA AUMENTATO RIASSORBIMENTO OSSEO..... | 29 |
| 1. MOLECOLE BIOATTIVE NATURALI PER LA TERAPIA DI MALATTIE DA AUMENTATO RIASSORBIMENTO OSSEO | 31 |
| INTRODUZIONE | 31 |
| APPROCCI TERAPEUTICI ALTERNATIVI: L'IMPORTANZA DELLA MEDICINA TRADIZIONALE | 31 |
| LA MEDICINA TRADIZIONALE AYURVEDICA..... | 32 |
| <i>Formulazioni farmaceutiche tipiche della medicina ayurvedica.....</i> | 33 |
| Il decotto preparato secondo la tradizione ayurvedica..... | 34 |
| <i>Asparagus racemosus.....</i> | 35 |
| Generalità | 35 |
| Costituenti chimici | 35 |
| Proprietà farmacologiche | 36 |
| Effetto gastrointestinale..... | 36 |
| Effetto galattagogo | 37 |
| Effetto immunomodulatorio..... | 38 |
| Effetto epatoprotettivo..... | 38 |
| Effetti tossici | 38 |
| <i>Emblica officinalis.....</i> | 39 |
| Generalità | 39 |
| Costituenti chimici | 40 |
| Proprietà farmacologiche | 42 |
| Effetto antitumorale..... | 42 |
| Effetto antidiabetico | 43 |
| Effetto epatoprotettivo..... | 43 |
| Effetto cardioprotettivo | 43 |
| Effetto gastrointestinale..... | 44 |
| Effetto antiossidante | 44 |
| Effetto immunomodulatorio | 44 |
| Effetto antipiretico e analgesico | 45 |

| | |
|--|-----------|
| Effetto citoprotettivo, antitussivo e gastroprotettivo..... | 45 |
| Effetto stimolante la memoria..... | 46 |
| Effetto sui disturbi oftalmici..... | 46 |
| Effetto di riduzione del colesterolo e della dislipidemia..... | 47 |
| Effetto antimicrobico e antimutageno..... | 47 |
| Effetto sull'osso..... | 47 |
| <i>Hemidesmus indicus</i> | 48 |
| Generalità..... | 48 |
| Composizione chimica..... | 49 |
| Proprietà farmacologiche..... | 49 |
| Effetto antitumorale..... | 49 |
| Effetto epatoprotettivo..... | 50 |
| Effetto anti-iperlipidemia..... | 51 |
| Effetto diuretico e renale..... | 51 |
| Effetto gastrointestinale..... | 51 |
| Effetto antiossidante..... | 52 |
| Effetto anti-infiammatorio..... | 52 |
| Effetto antinocicettivo..... | 52 |
| <i>Rubia cordifolia</i> | 53 |
| Generalità..... | 53 |
| Costituenti chimici..... | 54 |
| Proprietà farmacologiche..... | 55 |
| Effetto antiossidante..... | 55 |
| Effetto antidiabetico..... | 55 |
| Effetto anticonvulsivante..... | 55 |
| Effetto antispasmodico..... | 55 |
| Effetto antitrombotico..... | 56 |
| MATERIALE E METODO..... | 57 |
| ALLESTIMENTO DEI DECOTTI VEGETALI E LORO CARATTERIZZAZIONE..... | 57 |
| <i>Preparazione dei decotti vegetali</i> | 57 |
| <i>Caratterizzazione dei decotti vegetali</i> | 57 |
| Determinazione della quantità totale di flavonoidi..... | 57 |
| Determinazione della quantità totale di polifenoli..... | 57 |
| VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ: TEST DEL NEUTRAL RED..... | 58 |
| VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTI-OSTEOCLASTICA..... | 58 |
| <i>Isolamento di osteoclasti umani da sangue periferico</i> | 58 |
| <i>Incubazione degli osteoclasti con i decotti</i> | 59 |
| <i>Caratterizzazione degli osteoclasti</i> | 60 |
| VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ SU PRECURSORI OSTEOGENICI..... | 61 |
| <i>Colture cellulari di MSC</i> | 61 |
| <i>Vitalità cellulare</i> | 61 |
| ANALISI STATISTICA..... | 62 |
| RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 63 |
| CARATTERIZZAZIONE DEI DECOTTI VEGETALI..... | 63 |
| <i>Determinazione della quantità totale di flavonoidi</i> | 63 |
| <i>Determinazione della quantità totale di polifenoli</i> | 63 |
| SCREENING DI CITOTOSSICITÀ..... | 64 |
| VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTI-OSTEOCLASTICA..... | 65 |

| | |
|---|------------|
| <i>Valutazione dell'effetto sull'osteoclastogenesi</i> | 65 |
| <i>Valutazione dell'effetto di induzione apoptotica degli osteoclasti maturi</i> | 67 |
| VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ SU PRECURSORI OSTEOGENICI..... | 72 |
| CONCLUSIONI | 75 |
| 2. MOLECOLE BIOATTIVE SINTETICHE PER LA TERAPIA DI MALATTIE DA AUMENTATO RIASSORBIMENTO OSSEO | 77 |
| INTRODUZIONE | 77 |
| BISFOSFONATI..... | 77 |
| <i>Struttura chimica</i> | 77 |
| <i>Azione dei bisfosfonati sul riassorbimento osseo</i> | 79 |
| <i>Meccanismo d'azione a livello tissutale</i> | 80 |
| <i>Meccanismo d'azione a livello cellulare</i> | 80 |
| Inibizione del reclutamento e della formazione di nuovi osteoclasti (osteoclastogenesi) | 81 |
| Effetti sulle altre cellule | 81 |
| Inibizione dell'attività degli osteoclasti | 82 |
| Induzione dell'apoptosi osteoclastica..... | 83 |
| <i>Meccanismo d'azione molecolare</i> | 83 |
| MATERIALE E METODO | 85 |
| BISFOSFONATI IMPIEGATI | 85 |
| ANALISI DELLA CITOTOSSICITÀ: TEST DEL ROSSO NEUTRO | 86 |
| ANALISI DELL'ATTIVITÀ ANTI-OSTEOCLASTICA | 87 |
| <i>Valutazione dell'effetto sull'osteoclastogenesi</i> | 87 |
| <i>Valutazione dell'effetto di induzione apoptotica degli osteoclasti maturi</i> | 87 |
| <i>Valutazione dell'inibizione della attività osteoclastica di degradazione del collagene di tipo I</i> | 88 |
| ANALISI STATISTICA | 88 |
| RISULTATI E DISCUSSIONE | 89 |
| ANALISI DELLA CITOTOSSICITÀ | 89 |
| ANALISI DELL'ATTIVITÀ ANTI-OSTEOCLASTICA | 92 |
| CONCLUSIONI | 97 |
| BIBLIOGRAFIA | 100 |

INTRODUZIONE

IL TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è una particolare varietà di tessuto connettivo e, come tale, è costituito da cellule e da matrice intercellulare organica (*fibrillare* o *amorfa*) ed inorganica. Tuttavia, esso si differenzia nettamente da tutti gli altri tessuti connettivi per il fatto che la sua matrice presenta un elevato grado di mineralizzazione. La caratteristica mineralizzazione della matrice, così come l'abbondanza e la particolare distribuzione delle componenti organiche della sostanza intercellulare, conferiscono al tessuto proprietà meccaniche di durezza e resistenza alla pressione, alla trazione e alla torsione.

La matrice organica è per il 95% fibrillare e quindi costituita da fibre collagene di tipo I. Il restante 5% ne costituisce, invece, la componente amorfa in cui si disperdono le fibre ed è formata da proteine non collageniche (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteine, fattori di crescita, albumine ed immunoglobuline), glicoproteine, proteoglicani e lipidi. La matrice inorganica è costituita per l'85% circa da fosfati di calcio organizzati sotto forma di cristalli di idrossiapatite (HA), da carbonato di calcio (circa il 10%) e da altri sali (fosfato di Mg, fluoruro di Ca), oltre a tracce di Na, K, Sr, Mn, Zn, Cu e terre rare.

Essendo il principale deposito di ione calcio, il tessuto osseo riveste un ruolo fondamentale nel soddisfare le necessità metaboliche dell'intero organismo: la deposizione del calcio nell'osso e la sua mobilizzazione sono controllate da meccanismi endocrini, che contribuiscono in modo sostanziale alla regolazione dei livelli plasmatici del suddetto ione.

A seconda che la matrice intercellulare si disponga o meno a formare delle lamelle, sul piano morfologico si distinguono il *tessuto osseo lamellare*, di gran lunga più diffuso nella vita post-natale dei Mammiferi, e quello *non lamellare*, ontogeneticamente e filogeneticamente più antico. Ogni lamella, spessa da 3 a 7 μm , è costituita da cellule e sostanza intercellulare. Le cellule ossee sono accolte nelle lacune ossee, cavità a forma di lente biconvessa, dalle quali si irradiano canalicoli ossei che si anastomizzano con quelli delle lacune vicine appartenenti alla stessa lamella ed a lamelle contigue. Lacune e canalicoli formano un sistema continuo di cavità, che consentono gli scambi gassosi e metabolici tra il sangue, che scorre nei vasi del tessuto osseo oppure nelle cavità midollari, e le cellule ossee. Le lamelle, dunque, non si trovano isolate, ma si dispongono a formare sistemi particolari, oppure a costituire trabecole che si intrecciano e si anastomizzano. Per tale motivo, da un punto di vista macroscopico, si possono distinguere due tipi di osso: *compatto* e *spugnoso* (Figura 1). L'osso compatto si riscontra prevalentemente nelle diafisi delle ossa lunghe e

riveste il tessuto spugnoso delle ossa brevi e delle ossa piatte; la sua unità principale, l'*osteone*, è costituita dal *canale di Havers* - contenente i vasi sanguigni ed orientato parallelamente all'asse centrale dell'osso - e da lamelle ossee in strati paralleli disposte concentricamente attorno allo stesso. L'osso spugnoso si trova principalmente a livello delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle epifisi delle ossa lunghe; le sue lamelle sono disposte in strati che si aggregano a formare trabecole più o meno spesse e variamente anastomizzate a delimitare spazi intercomunicanti, denominati cavità midollari, in quanto occupate da midollo osseo ematopoietico.

Sebbene caratterizzati dagli stessi elementi cellulari e da una sostanza intercellulare simile, i tessuti compatto e spugnoso rivestono ruoli differenti: il primo ha prevalentemente una funzione meccanica, essendo calcificato per l'80-90%; il secondo, calcificato per il 5-25%, assolve a funzioni metaboliche (1).

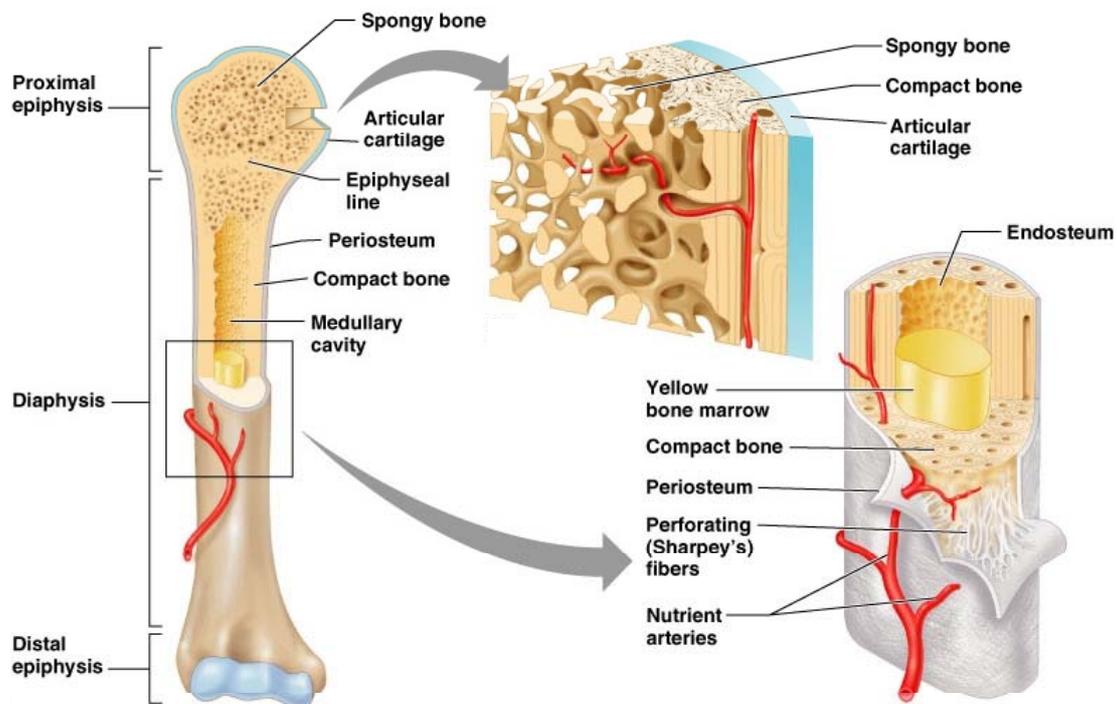


Figura 1. Struttura macroscopica del tessuto osseo.

La superficie esterna dell'osso è rivestita da una lamina connettivale fibrosa a fasci intrecciati, il periostio, assente in corrispondenza delle superfici articolari, che sono rivestite da cartilagine, e delle zone d'inserzione di tendini e legamenti. Nel caso della diafisi delle ossa lunghe, il canale midollare è rivestito da connettivo fibroso più scarso, l'endostio.

Nonostante la sua apparente staticità ed effettiva rigidità, il tessuto osseo è estremamente dinamico: l'equilibrio macroscopico, dal quale deriva la sua integrità meccanica, è il risultato

di una continua rimozione di osso (**riassorbimento**), seguita dalla deposizione di nuovo tessuto (**formazione**); detti processi si verificano grazie ad una stretta correlazione funzionale tra i due principali attori cellulari dell'osso, gli osteoblasti e gli osteoclasti, le cui attività, rispettivamente di formazione e riassorbimento, in condizioni fisiologiche si trovano in equilibrio (Figura 2).

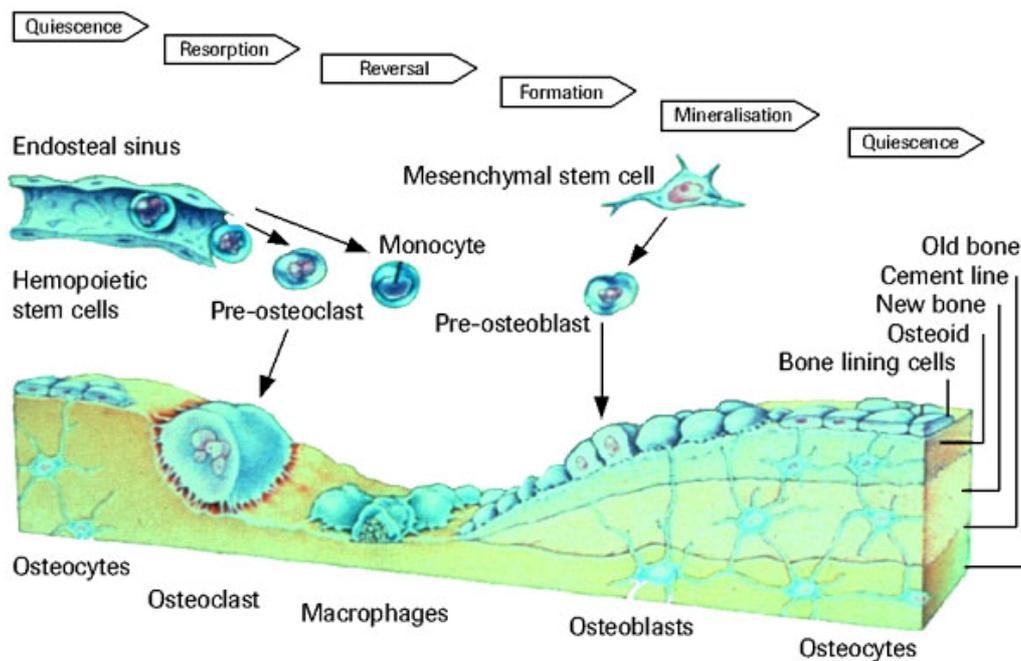


Figura 2. Il rimodellamento osseo.

Durante il corso della vita si verificano processi di **modellamento**, importanti per l'accrescimento in lunghezza e diametro dell'osso, e di **rimodellamento**, fondamentali per la regolazione della concentrazione di calcio nel plasma e per il rinnovamento strutturale e funzionale dello scheletro. Numerosi fattori, che controllano l'attività dei vari elementi cellulari, sono coinvolti nella regolazione del metabolismo scheletrico.

Cellule del tessuto osseo

Le cellule del tessuto osseo si distinguono morfologicamente in 4 varietà: le *cellule osteoprogenitrici* (dette anche *preosteoblasti*), gli *osteoblasti*, gli *osteociti* e gli *osteoclasti* (Figura 3). È tuttavia importante sottolineare che le cellule osteoprogenitrici, gli osteoblasti e gli osteociti altro non sono che fasi funzionali consecutive dello stesso tipo cellulare, che deriva a sua volta dalla differenziazione in senso osteogenico della cellula mesenchimale pluripotente dei tessuti connettivi; possono pertanto essere considerate cellule autoctone

dell'osso. Gli osteoclasti, invece, originano da precursori immigrati nel tessuto osseo dal sangue, i *preosteoclasti*, che si differenziano da cellule staminali del midollo osseo ematopoietico.

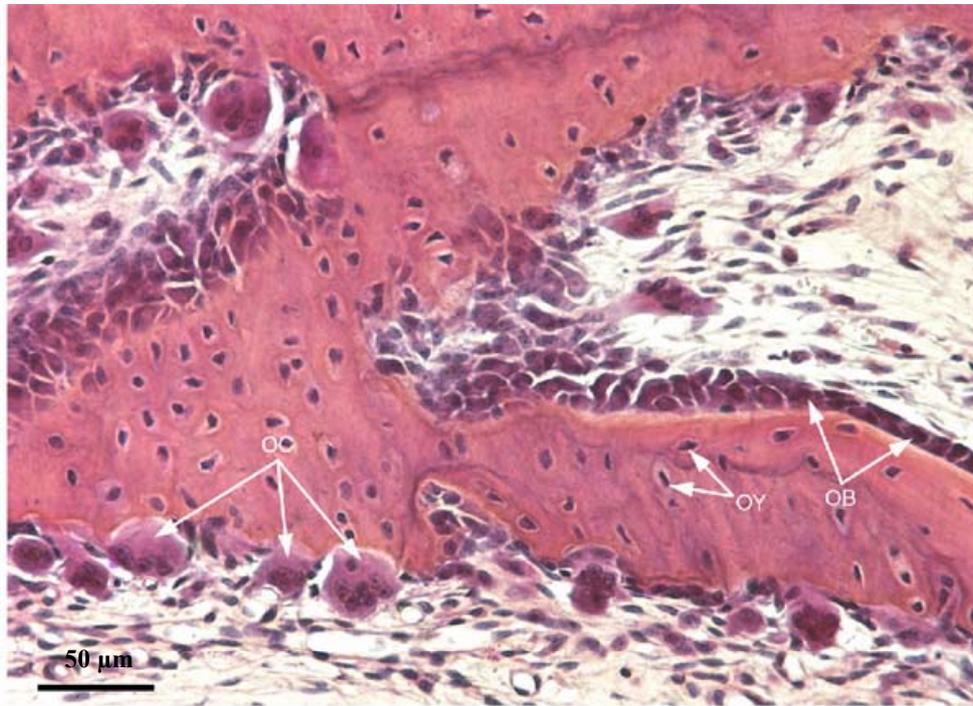


Figura 3. Citologia del tessuto osseo. Osteoblasti (OB), osteociti (OY), osteoclasti (OC).

Le **cellule osteoprogenitrici**, o **preosteoblasti**, hanno forma piatta e allungata, citoplasma scarso e basofilo ed un nucleo eucromatico e nucleolato. Si collocano sulle superfici libere delle ossa: a livello dello strato più interno del periostio apposto all'osso, il cosiddetto strato osteogenico di Ollier, riccamente vascolarizzato, e a livello dell'endostio, in vicinanza dei capillari sanguigni. Le cellule osteoprogenitrici sono dotate di capacità proliferativa, che si manifesta in modo particolare durante l'accrescimento corporeo, ma che può esplicarsi anche durante la vita adulta. Sono in grado di produrre e secernere le *bone morphogenetic proteins* (BMPs), fattori di crescita e di differenziamento, che possono agire sia in maniera autocrina che paracrina. La differenziazione delle cellule preosteoblastiche in osteoblasti maturi avviene grazie allo stimolo di numerosi fattori, quali il *paratormone* (PTH), l'*ormone della crescita* (GH) ed il *Transforming Growth Factor* β (TGF- β). Il *Fibroblast Growth Factor* (FGF) è un potente agente mitogeno per le cellule osteoblastiche (2). Una volta intrapresa la via del differenziamento, le cellule osteoprogenitrici si trasformano in osteoblasti.

Gli **osteoblasti** svolgono intensa attività osteogenetica in quanto producono la matrice organica e regolano la deposizione di quella inorganica. Hanno forma globosa o poliedrica e

tendono a giustapporsi le une alle altre, allineandosi sulle superfici ossee in via di formazione. Si tratta di cellule estremamente voluminose (dimensioni pari a circa 20 μm), dal nucleo rotondeggiante, eucromatico e nucleolato e dal citoplasma abbondante e basofilo. Istochimicamente si caratterizzano per la positività alla reazione per la fosfatasi alcalina. Al microscopio elettronico, gli osteoblasti presentano un ergastoplasma sviluppato e un grande apparato di Golgi; nel citoplasma periferico possono essere presenti dei corpi delimitati da membrana, detti *globuli calcificanti*, di 0,2-0,5 μm di diametro, contenenti una matrice a medio arresto elettronico, in cui sono localizzati enzimi glicoproteici, quali la fosfatasi alcalina e la pirofosfatasi. Gli osteoblasti comunicano tra loro e con gli osteociti vicini tramite giunzioni serrate (*gap junctions*), attraverso le quali avviene lo scambio per la coordinazione dell'attività metabolica e della deposizione della matrice ossea.

Gli osteoblasti producono e secernono fattori solubili, il più studiato dei quali è il TGF- β , appartenente alla stessa famiglia delle BMPs. Questo, agendo in maniera paracrina ed autocrina, modula la sintesi di proteine e, in particolare, ha un effetto diretto sulla sintesi del collagene; incrementa quindi il numero di cellule con fenotipo osteoblastico e agisce sul metabolismo e sulla sintesi macromolecolare degli osteoblasti maturi. Il TGF- β viene secreto come precursore inattivo, convertito nella forma attiva ad opera di proteasi presenti nell'ambiente extracellulare. Oltre al TGF- β , gli osteoblasti producono gli *insulin-like growth factors* (IGFs), molecole proteiche strettamente correlate tra loro, con una spiccata azione stimolante la crescita ed il metabolismo osteoblastico. Un ruolo importante è svolto anche dal PTH, che interviene sia nella formazione sia nel riassorbimento del tessuto osseo, influenzando il sistema *osteoprotegerina* (OPG)/ *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL). In particolare, è stato osservato che la somministrazione intermittente di PTH è in grado di attivare questo sistema, incrementando l'attività antiriassorbitiva dell'osteoprotegerina e stimolando l'attività osteoblastica (attività anabolizzante) (3).

Il destino degli osteoblasti è triplice: nella maggior parte dei casi rimangono murati nella matrice extracellulare da loro deposta e si differenziano in osteociti ma, in corrispondenza delle superfici rivolte verso il periostio e verso l'endostio, assumono una morfologia piatta e vanno a costituire le cellule di rivestimento o "bone lining cells", cellule che si ritiene rivestano il ruolo di mediatori degli scambi fra il sangue ed il liquido interstiziale che circola nelle lacune e nei canalicoli. Infine, gli osteoblasti possono andare incontro ad apoptosi e tale processo risulta inibito da fattori di crescita (IL-6, TGF β) e dal PTH (4).

Gli **osteociti** sono le cellule più numerose nell'osso maturo. Si tratta essenzialmente di osteoblasti che, dopo aver preparato la sostanza ossea, rimangono imprigionati nella matrice

calcificata all'interno delle lacune ossee. Si tratta di cellule terminali, con un'autonomia di vita finita e regolata da meccanismi endocrini, responsabili del mantenimento dell'osso e capaci di avviarne il rimaneggiamento. Nel tessuto osseo non lamellare, gli osteociti appaiono come cellule globose, mentre in quello lamellare (dove le fibre collagene sono disposte parallelamente) hanno la forma di un ellissoide a tre assi in cui l'asse maggiore è sempre parallelo alle fibre collagene; inoltre, presentano prolungamenti citoplasmatici più o meno lunghi e ramificati. Il corpo cellulare ha sede nelle lacune ossee; da queste si dipartono esili canalicoli ramificati che contengono i prolungamenti degli osteociti. I canalicoli sono anastomizzati con quelli provenienti dalle lacune circostanti; alcuni di essi si aprono sulle superfici vascolarizzate del tessuto osseo (*canali di Havers* e spazi midollari). Tramite il sistema dei prolungamenti e dei canalicoli, gli osteociti possono quindi effettuare scambi metabolici tra di loro e con il sistema circolatorio, scambi che sarebbero altrimenti impossibili a causa dell'elevato grado di mineralizzazione della matrice. Tali scambi sono favoriti dalla presenza di giunzioni comunicanti (*gap junctions*) tra le estremità dei prolungamenti degli osteociti.

All'osservazione al microscopio elettronico appare evidente la presenza di uno spazio che separa la membrana cellulare degli osteociti dalla matrice mineralizzata. Tale spazio risulta sottile ed occupato da fibre collagene e materiale amorfo, di natura presumibilmente glicoproteica, che non è in grado di mineralizzare. Poiché in tale spazio circola liquido interstiziale, si ritiene che le glicoproteine in esso presenti abbiano il ruolo di regolare gli scambi tra le cellule ed i liquidi interstiziali stessi, analogamente a quanto avviene nella membrana basale degli epitelii. All'interno dei canalicoli, i prolungamenti degli osteociti possono essere a mutuo contatto e sembra siano in grado di effettuare movimenti contrattili, cui alcuni studiosi hanno attribuito un ruolo nel favorire la circolazione del liquido interstiziale.

Quando l'osteocita giunge al termine del suo ciclo vitale, ritrae i propri prolungamenti e degenera. Esso non va incontro a mitosi: infatti, l'aumento di spessore di un segmento osseo può realizzarsi solo per apposizione e non risulta mai essere di tipo interstiziale.

Gli **osteoclasti** vengono così denominati in quanto deputati alla degradazione della matrice ossea. Come già accennato, non sono cellule autoctone del tessuto osseo; i *preosteoclasti*, infatti, derivano dalla cellula staminale emopoietica ed il loro precursore immediato appartiene alla linea monocito-macrofagica (5). I preosteoclasti sono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi in cui avvengono i processi di riassorbimento osseo; in questi siti avviene la loro fusione in sincizi polinucleati in grado di dissolvere la componente

minerale e di digerire enzimaticamente le componenti organiche del tessuto osseo. Gli *osteoclasti maturi* sono quindi cellule dalle notevoli dimensioni (100-200 μm) e plurinucleate, in quanto originate dalla fusione dei singoli precursori mononucleati: in un osteoclasto possono, infatti, essere presenti fino a 50 nuclei, con cromatina lassa ed il nucleolo ben evidente. Il citoplasma risulta debolmente basofilo o addirittura acidofilo e positivo alle reazioni per la dimostrazione della fosfatasi acida. Si trovano localizzati sulle superfici ossee in via di riassorbimento adesi alla matrice mineralizzata in via di riassorbimento e solitamente accolti in una cavità, detta *lacuna di Howship*, che si forma a seguito dell'azione erosiva delle cellule stesse.

La morfologia degli osteoclasti varia sulla base del momento funzionale in cui si trovano. Quando si trovano liberi e mobili hanno una forma indefinita a causa della presenza di *pseudopodi lamellari* in corrispondenza dei quali, sotto il plasmalemma, microfilamenti del citoscheletro si dispongono a formare un fine reticolato. Nel momento in cui gli osteoclasti, sollecitati da stimoli locali e sistemici, aderiscono alla superficie ossea, la loro morfologia subisce alcune modificazioni: le cellule retraggono gli pseudopodi e sulla membrana plasmatica compaiono numerose invaginazioni che rappresentano una riserva di membrane che la cellula utilizzerà nel momento in cui entrerà in attività. Inoltre, gli organuli citoplasmatici assumono una distribuzione totalmente casuale. Nel momento in cui tali osteoclasti a riposo diventano attivi, vanno incontro ad ulteriori e rapide alterazioni morfologiche. La più evidente è rappresentata dall'assunzione di una ben definita polarità cellulare: nell'osteoclasto maturo, infatti, è possibile distinguere un versante cellulare in contatto con il fronte di erosione, detto "zona apicale", e la restante porzione detta "zona baso-laterale" (Figura 4). Nella zona apicale è visibile, già al microscopio ottico, un *orletto a spazzola*, che appare come una serie di prolungamenti della membrana plasmatica lunghi e sfrangiati cui corrispondono, a livello ultrastrutturale, numerose ed irregolari introflessioni citoplasmatiche nelle quali si riscontrano particelle mineralizzate e non mineralizzate di matrice. Le strutture realmente responsabili del processo di adesione dell'osteoclasto alla matrice ossea sono i *podosomi*, protrusioni coniche localizzabili in prossimità delle introflessioni citoplasmatiche suddette ed il cui asse centrale è formato da fascetti di *F-actina* rivestiti da una guaina di *vincolina* che, a sua volta, si pone in contatto con un'ulteriore molecola proteica detta *talina*. Oltre ad un ruolo di ancoraggio alla matrice ossea, i podosomi rivestirebbero anche il ruolo di reclutatori delle componenti della matrice cellulare ai fini di facilitarne la degradazione. Sempre nella zona apicale e più precisamente nella porzione di citoplasma rivolta verso la superficie dell'osso, sono concentrati i lisosomi, che sono

fondamentali nel processo del riassorbimento osseo in quanto riversano enzimi in grado di degradare la matrice ossea in sede extracellulare. Nella zona baso-laterale, invece, si trovano i nuclei, il complesso di Golgi ben sviluppato e multiplo, i mitocondri e poliribosomi liberi; il RER è ridotto. La zona baso-laterale è rivolta verso i capillari.

Le variazioni nella morfologia osteoclastica si rendono possibili grazie ad una riorganizzazione costante del citoscheletro cellulare; in particolare, è stato dimostrato che i podosomi sono strutture altamente dinamiche in grado di essere distrutte e/o rigenerate rapidamente in seguito a stimoli endocrini e locali. Per questo motivo, osteoclasti maturi e quindi già differenziati possono migrare da una sede all'altra ed iniziare un nuovo ciclo di riassorbimento.

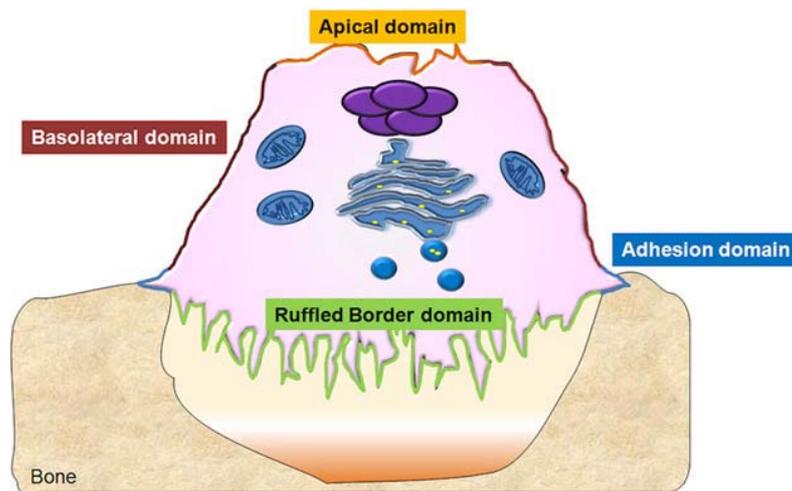


Figura 4. Diagramma schematico raffigurante un osteoclasto polarizzato che presenta domini distinti della membrana plasmatica. (Da: Del Fattore A, Teti A, Rucci N. 'Bone cells and the mechanisms of bone remodelling'. *Frontiers in Bioscience* 2012;E4:2302-2321).

Ossificazione e sviluppo del tessuto osseo

Il processo di ossificazione si realizza secondo due processi diversi: si parla, infatti, di *ossificazione diretta* (anche detta *intramembranosa*) e di *ossificazione indiretta* (anche detta *per sostituzione di un modello cartilagineo*). Le ossa membranose si formano direttamente in seno ad un tessuto connettivo primitivo, per differenziazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti. Durante il processo di ossificazione indiretta, le ossa neoformate si sviluppano e si accrescono a partire da un modello cartilagineo, che viene sostituito totalmente o parzialmente da tessuto osseo. Lo sviluppo delle ossa piatte del cranio - quali l'osso frontale, il parietale e l'occipitale - e delle clavicole avviene esclusivamente per ossificazione intramembranosa. Tutte le altre ossa si originano in seguito ad un meccanismo di

ossificazione indiretta, incluse le ossa lunghe e le vertebre, ma in queste ultime la parte immediatamente sottostante il periostio si sviluppa da cellule che si differenziano dallo strato interno del periostio stesso (ossificazione intramembranosa). Tali ossa si formano e si accrescono in lunghezza per ossificazione indiretta, ma aumentano in spessore per deposizione subperiostale.

La formazione e lo sviluppo delle ossa della volta cranica, come l'osso frontale o il parietale, rappresentano, quindi, un valido modello per la comprensione del processo di **ossificazione intramembranosa**. Nelle prime fasi della gestazione, nel mesenchima e nel connettivo della volta cranica, a livello della zona destinata a divenire un osso dermico, si iniziano a generare i vasi sanguigni e, parallelamente, si assiste ad un aumento delle mitosi e della fibrillogenesi. In questo strato di derma riccamente vascolarizzato si formano centri di ossificazione primaria, in cui le cellule mesenchimali cominciano a differenziarsi in osteoblasti. Questi iniziano a creare sottili lamelle di osteoide che si distribuiscono a formare una rete ramificata seguendo le ramificazioni dei vasi. Altre cellule si differenziano in osteoblasti, formando lamine sulla superficie delle trabecole, aumentano di volume e cominciano a secernere un altro strato di osteoide, nel quale rimangono intrappolate. I prolungamenti citoplasmatici degli osteoblasti ne consentono il contatto reciproco. Successivamente, si osserva la deposizione dei sali di calcio nella matrice preossea ed alla progressiva incorporazione della matrice del connettivo preesistente nella matrice del tessuto osseo neoformato, che risulta del tipo a fibre intrecciate. Gli osteoblasti, rimasti murati in essa, si differenziano in osteociti e restano in contatto con la superficie tramite i canalicoli e le lacune che ne circondano i prolungamenti e il corpo. Il progressivo reclutamento di nuove cellule mesenchimali a livello della matrice di nuova formazione, consente alle trabecole ossee il proseguimento del loro accrescimento in lunghezza e spessore. Tale accrescimento si arresta solo nel momento in cui le ossa neoformate si incontrano a livello delle suture, formando quindi la calotta cranica ed il massiccio facciale. Nelle regioni destinate a formare tavolati corticali di osso compatto, gli ampi spazi compresi fra le trabecole si riducono per apposizione, in direzione centripeta, di nuova matrice ossea da parte di altri osteoblasti; al termine del processo, si assisterà alla trasformazione di tali spazi in sistemi organizzati di canali attraversati da vasi, ovvero alla formazione degli *osteoni primari*. La lamella più esterna dell'osso è quella che si forma per prima e, con la deposizione progressiva di altre lamelle, si osserva un restringimento dei canali di Havers. Gli osteoni primari saranno in seguito riassorbiti dagli osteoclasti e, a livello delle cavità secondarie generate dall'attività erosiva di tali cellule, si avrà la deposizione di tessuto osseo lamellare. Fra i tavolati corticali

interno ed esterno è compresa la *diploe*, uno strato di tessuto osseo spugnoso soggetto a continuo rimodellamento nel corso dello sviluppo, che contiene anche cellule che si sviluppano in un tessuto reticolare ed emopoietico, noto come *midollo osseo rosso*.

Il processo di **ossificazione encondrale**, così come avviene in un osso lungo, è schematizzato in Figura 5. Nello sviluppo di un arto le cellule mesenchimali si aggregano e si dividono formando uno scheletro blastemiale, una massa cellulare compatta che ricalca la futura forma dell'osso. All'interno della massa le cellule mesenchimali si differenziano in condroblasti, che depositano cartilagine e trasformano i blastemi in una serie di modelli cartilaginei che verranno successivamente distrutti e sostituiti da tessuto osseo. Ogni modello si accresce sia interstizialmente che per apposizione.

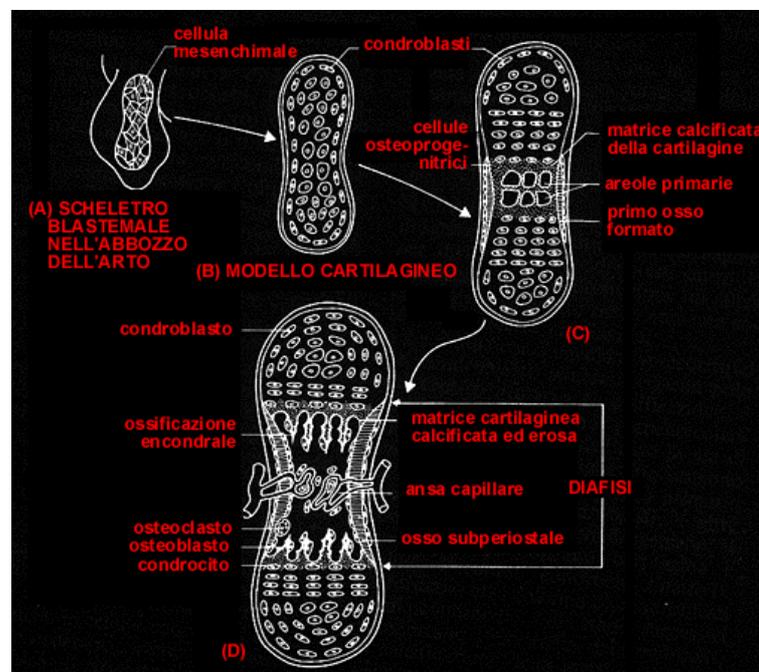


Figura 5. Ossificazione encondrale. (Modificata da: Rowe AHR, Johns RB. 'Il testo-guida degli studi odontoiatrici'. Piccin 1986).

La prima indicazione di inizio dell'ossificazione nel modello cartilagineo si verifica nella parte centrale della diafisi; in tale sito i condroblasti appaiono ipertrofici e risultano caratterizzati da un'intensa attività proliferativa, un accumulo di glicogeno al loro interno ed un'estesa vacuolizzazione del citoplasma. Come conseguenza dell'ipertrofia le lacune cartilaginee si ingrandiscono a spese della matrice circostante, che si riduce a sottili seppimenti, talora perforati, che calcificano parzialmente. I condrociti ipertrofici, ormai intrappolati all'interno della matrice mineralizzata, sono impossibilitati ad effettuare qualsiasi

tipo di scambio metabolico, per cui vanno incontro a degenerazione e morte cellulare. Gli enzimi lisosomiali liberati dai condrociti determinano un ulteriore allargamento delle lacune, trasformandole in areole primarie, e lisano qualsiasi frammento protoplasmatico in esse contenuto (Figura 5, c).

Contemporaneamente, alla periferia di questo tratto dell'abbozzo scheletrico, a livello della parte profonda del pericondrio costituito da connettivo fibroso, si ha un iniziale processo di ossificazione intramembranosa per deposizione subpericondrale: le cellule mesenchimali contenute nel pericondrio della diafisi presuntiva si differenziano in cellule osteoprogenitrici, alcune delle quali si dividono e si trasformano in osteoblasti. Tali cellule producono uno stretto cilindro di osso maturo, il *collare* o *manicotto periostale*; il pericondrio evolve in periostio e l'ulteriore deposizione di osso è detta subperiostale. Probabilmente, cellule osteoprogenitrici di un secondo tipo provenienti dalla tonaca avventizia dei vanguigni locali, i preosteoclasti, invadono il periostio e si trasformano in osteoclasti che erodono l'osso immaturo. I vasi penetrano nell'osso attraverso i fori generati, dando inizio all'osteogenesi nel centro primario di ossificazione. Le anse capillari sono accompagnate da cellule mesenchimali che si differenziano in cellule ossee e cellule staminali emopoietiche (Figura 5, d). Gli enzimi lisosomiali dei condrociti agonizzanti e degli osteoclasti viventi provvedono a erodere ulteriormente la matrice calcificata della cartilagine. È possibile che anche le cellule endoteliali dei capillari abbiano un'attività condrolitica. Il risultato finale è che, in seguito alla demolizione dei setti, le areole primarie adiacenti confluiscono a formare le areole secondarie e le cellule mesenchimali, che invadono il centro primario di ossificazione insieme ai vasi sanguigni, si trasformano in preosteoblasti. La vascolarizzazione del centro comporta un aumento del rifornimento di ossigeno, che potrebbe determinare la formazione di osteoblasti anziché condroblasti. Gli osteoblasti, che aumentano in numero in seguito alla divisione dei preosteoblasti, depositano osso sulla superficie dei setti in disintegrazione della matrice cartilaginea calcificata. L'osso intrecciato, acidofilo, si distingue facilmente dalla matrice basofila della cartilagine. Gli osteoclasti scavano la parte mediana della diafisi in corso di sviluppo, formando la cavità midollare, sede del midollo osseo, che costituisce il serbatoio dei progenitori sia mesenchimali che emopoietici.

L'allungamento delle ossa lunghe si realizza per divisione di cellule condrogeniche situate al margine della cartilagine, divisione di condroblasti entro la cartilagine e produzione di altra cartilagine. Il tessuto osseo neoformato sostituisce infine il tessuto cartilagineo.

L'aumento in larghezza del corpo di un osso lungo è dovuto esclusivamente alla deposizione subperiostale di osso. Gli osteoblasti, che si differenziano a partire da cellule

osteogeniche del periostio che circonda la diafisi, depongono diversi strati di osso lamellare. Contemporaneamente il corpo della diafisi viene riassorbito dall'interno, quindi la cavità midollare si allarga. La maggior parte del tessuto osseo neoformato è depositata nei sistemi haversiani intorno a vasi sanguiferi a decorso longitudinale, collegati a quelli del periostio.

Omeostasi scheletrica

Con il termine di “omeostasi scheletrica” viene indicato il delicato e fondamentale equilibrio, esistente per tutta la durata della vita, fra la struttura e l'architettura dell'osso da un lato ed eventuali variazioni delle sollecitazioni meccaniche dall'altro.

Essendo il tessuto osseo una riserva all'interno della quale è immagazzinata una grande quantità di sali minerali, la plasticità di cui è dotato lo rende capace di cedere e/o accumulare sostanze inorganiche in modo tale da regolarne la concentrazione ematica, mantenendola costante e quindi non soggetta a variazioni legate all'introito alimentare o all'escrezione. In particolare, l'omeostasi del calcio risulta fondamentale in quanto i livelli ematici di calcio modulano importanti fenomeni biologici quali la contrazione muscolare, la secrezione, la fagocitosi, la coagulazione del sangue, i rapporti fra le cellule adiacenti e la loro eventuale fusione, la mitosi, la fecondazione, il trasporto assonico e la trasmissione sinaptica.

Dunque, il tessuto osseo è parte integrante del delicato meccanismo di regolazione dell'*omeostasi minerale*, ovvero dell'equilibrio esistente fra l'organismo nella sua complessità ed i livelli ematici dei sali minerali.

Va sottolineato che della totalità del calcio presente nel nostro organismo, solo una piccolissima frazione (circa l'1%) si trova in una forma facilmente e direttamente utilizzabile, ovvero sottoforma di sali facilmente solubili, particolarmente concentrati nella matrice neo-deposta e di recente mineralizzazione (più prossima al torrente sanguigno). Le strutture ossee più vecchie, invece, presentano una componente minerale di non facile solubilizzazione.

L'organismo è in grado di mantenere una concentrazione basale di calcio a livello ematico proprio grazie a tale componente minerale facilmente mobilizzabile; tuttavia, essa è piuttosto bassa (7-8 mg/100 ml di sangue) e risulta appena sufficiente per soddisfare le esigenze prioritarie dell'organismo. Per soddisfare richieste più massicce di calcio, l'organismo deve ricorrere a riserve meno facilmente e meno immediatamente utilizzabili e ciò implica l'elaborazione di strategie estremamente complesse e di gran lunga lontane dal semplice equilibrio sale deposto/sale in soluzione. In altri parole, l'omeostasi minerale garantita dall'osso non può essere intesa come la semplice e diretta solubilizzazione di sali

precedentemente depositi, ma prevede la smobilitazione degli osteoni, con il contemporaneo disassemblaggio delle loro componenti organica e minerale.

L'omeostasi del calcio è quindi quasi interamente assicurata dal processo di riassorbimento di tessuto osseo ad opera degli osteoclasti.

Modellamento e rimodellamento dell'osso

Il processo di **modellamento osseo** consiste nell'incremento in lunghezza e diametro delle ossa lunghe. Nonostante l'accrescimento delle ossa sia abbondante durante lo sviluppo, non si assiste ad un'ampia variazione delle loro proporzioni. La forma originaria di un osso lungo viene mantenuta ad opera di un processo di rimaneggiamento costante, che si verifica in particolare nella regione della metafisi. Tale processo consiste in una progressiva erosione di osso dall'esterno del corpo e deposizione di osso all'interno.

La costante degradazione e neodeposizione di materiale, garantisce il rinnovamento delle ossa, con ritmo ed estensione variabili in relazione all'età. Ciò comporta mutamenti nell'architettura e nella struttura delle ossa. Nell'insieme, questo fenomeno viene definito **rimodellamento osseo** e, sia pure in grado ridotto, persiste per tutta la vita. Infatti, pur essendo geneticamente influenzata, la forma di un osso può essere alterata da stimoli meccanici e tali variazioni di carico fanno sì che la morfologia di un segmento scheletrico, nonché l'architettura e la struttura del tessuto osseo, risultino soggetti a rimodellamento anche dopo che la fase di accrescimento è giunta al termine. È stata dimostrata una stretta relazione fra l'aumento delle sollecitazioni meccaniche ed un incremento nella neodeposizione di tessuto osseo; al contrario, nelle sedi non sottoposte a carico, il tessuto osseo è soggetto ad un più intenso e rapido riassorbimento. Risulta difficile comprendere come le sollecitazioni meccaniche possano modulare l'attività delle cellule ossee dato che queste ultime si trovano protette da una matrice mineralizzata. È stato ipotizzato che, analogamente a quanto avviene per molti cristalli, la matrice ossea, una volta andata incontro a deformazione, eserciti potere piezoelettrico, ovvero sia in grado di generare correnti a basso voltaggio; queste rappresenterebbero un segnale per stimolare e/o inibire l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti.

I processi di formazione e riassorbimento osseo avvengono contemporaneamente in varie zone e con tempi e sequenza di eventi cellulari nettamente diversi da quelli del **rimodellamento osseo**: mentre nel processo di rimodellamento formazione e riassorbimento si susseguono e hanno un andamento ciclico, nel modellamento i due eventi avvengono

contemporaneamente e in modo continuo. Durante il processo di modellamento gli osteoclasti riassorbono il tessuto osseo endostale mentre gli osteoblasti appongono nuova matrice ossea sulla superficie del periostio; ne consegue un aumento delle dimensioni ossee che ha una funzione principalmente meccanica importante durante l'accrescimento. Il rimodellamento, che rappresenta un rinnovamento strutturale e funzionale dello scheletro, consente allo stesso di sostenere gli stress meccanici e rappresenta una riserva di ioni - in particolare di calcio e fosforo - necessari al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo.

Indipendentemente dalla finalità per cui si verificano, i processi di riassorbimento e formazione di tessuto osseo avvengono sempre con la stessa modalità, all'interno di unità note come 'unità multicellulari di base' (Basic Multicellular Unit: BMU) (Frost, 1969), descritte inizialmente come unità di rimodellamento dell'osso corticale, ma successivamente evidenziate anche nell'osso trabecolare (6) (Figura 6).

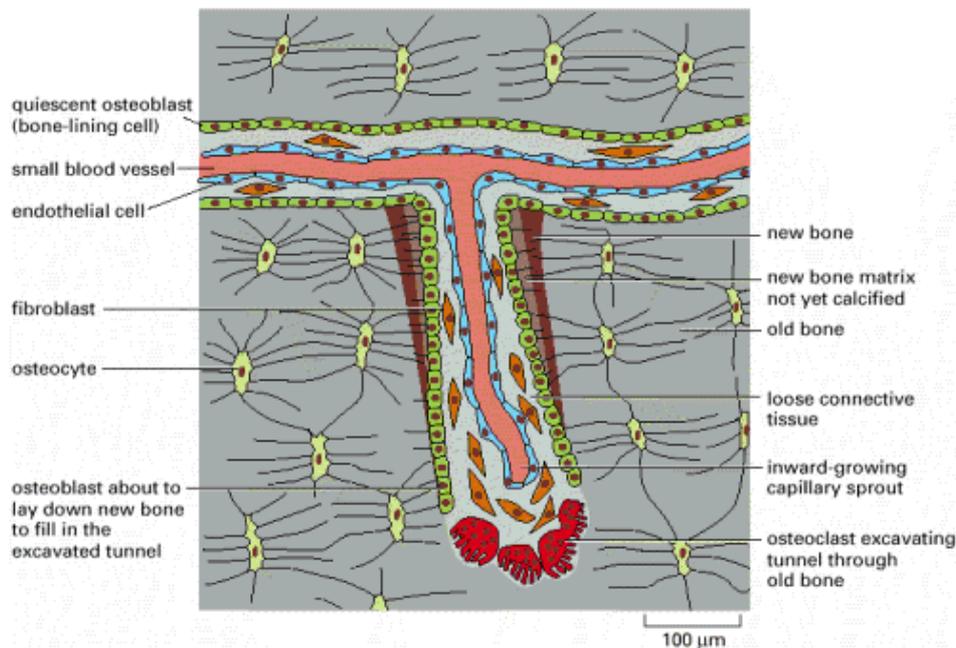


Figura 6. Basic Multicellular Unit.

Le fasi del rimodellamento sono schematizzate in Figura 7: il processo ha inizio con la generazione di segnali di attivazione, cui segue il “riassorbimento” (fase 3), cioè l’attivazione di cellule osteoclastiche quiescenti e di precursori che cominciano a scavare una cavità sulla superficie ossea. Le cellule osteoclastiche si polarizzano: sulla superficie adiacente all’osso compare un caratteristico orletto striato, detto “ruffled border”, a livello del quale inizia il processo di riassorbimento. Il processo apoptotico, conclusivo della fase 3, è influenzato da numerosi fattori, quali estrogeni, bisfosfonati e TGF- β . Si assiste quindi al “reversal”,

momento preparatorio dell'attivazione dei precursori delle cellule osteoblastiche deputate alla formazione di nuovo tessuto osseo ed alla mineralizzazione (fasi 4 e 5). Al termine delle suddette fasi, le cellule osteoblastiche tornano ad uno stato di quiescenza. In condizioni ideali, la quantità di osso neoformato eguaglia quella di osso riassorbito di modo che non vi sia variazione di volume osseo (7).

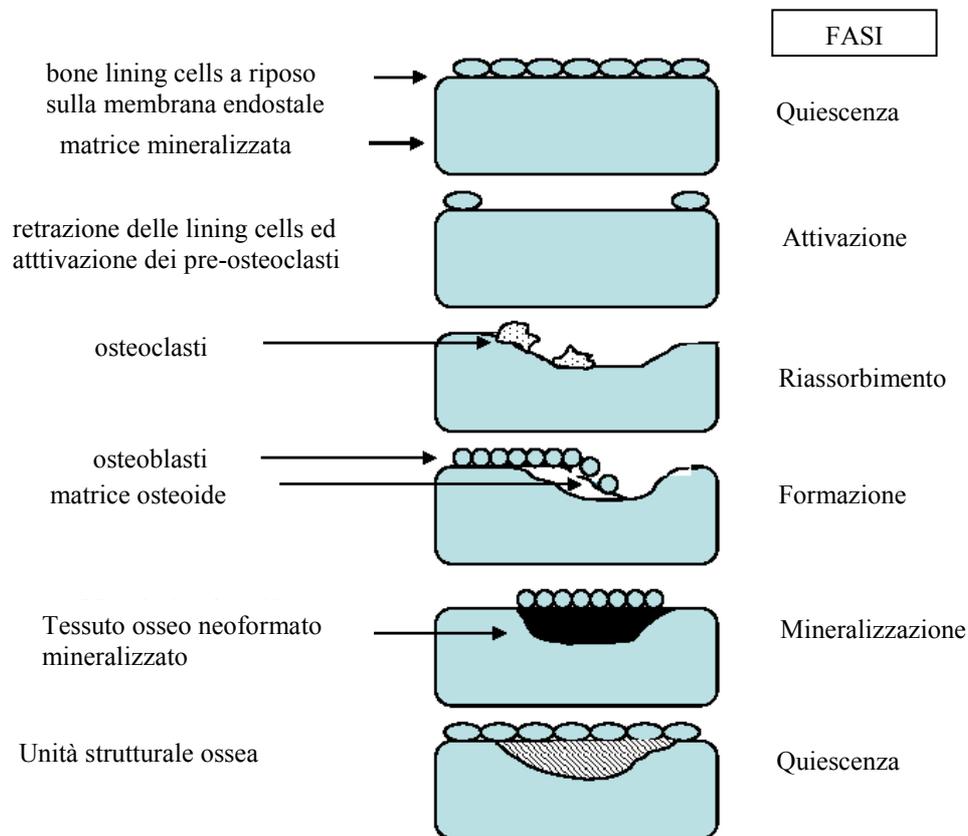


Figura 7. Le fasi di rimodellamento osseo (Modificata da: Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. 'Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process'. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E151-7).

Il cambiamento del tessuto osseo corticale e trabecolare non avviene nello stesso modo nel corso degli anni. La perdita di osso compatto, il maggior fattore di rischio per le fratture di femore e polso, inizia dopo i 40 anni di età con un incremento 5-10 anni dopo la menopausa. D'altra parte, la perdita di osso trabecolare avviene principalmente dopo la menopausa.

In conclusione, il rimodellamento comprende i processi di riassorbimento e formazione ossea nello stesso sito non accompagnati da modificazioni architetturali sostanziali. Detto processo ha prevalentemente una funzione metabolica in quanto è responsabile, sia nell'adulto che nel bambino, del mantenimento dell'omeostasi scheletrica, di cui si è discusso in

precedenza, ma è importante anche perché consente all'osso di essere soggetto a rimodellamento in funzione delle sollecitazioni meccaniche cui viene sottoposto.

Osteoclasti e riassorbimento osseo

Gli osteoclasti circolano liberamente nel torrente sanguigno, sino alla sede in cui è richiesta la loro attività. Il reclutamento dei precursori e la loro trasformazione in osteoclasti, fenomeno noto con il termine *osteoclastogenesi*, avviene a seguito di una serie di segnali sistemici e locali che partono dalle cellule stromali di supporto, strettamente collegate agli osteoblasti [8,9,10,11,12,13] (Figura 8). Fra questi segnali, uno stimolo indiretto al differenziamento osteoclastico è rappresentato dal paratormone (PTH) che agisce sugli osteoblasti stimolandoli alla secrezione di fattori solubili detti *osteoclast activating factors* (OAF), come il *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) e RANKL, molecole che, legandosi a recettori specifici espressi sulla superficie dei monociti, li inducono al differenziamento osteoclastico. Risultati di esperimenti condotti *in vitro* hanno proprio dimostrato come fattori di stimolo del riassorbimento osseo - inclusi il paratormone, la vitamina D ed alcune citochine - siano incapaci di stimolare gli osteoclasti a riassorbire l'osso, a meno che questi non siano mantenuti in coltura insieme ad osteoblasti (14). La natura chimica degli OAF non è completamente nota: probabilmente alcuni di questi fanno parte della famiglia delle BMPs, potenti stimolatori del differenziamento osteoclastico *in vitro*.

Il processo di **riassorbimento osseo** ha inizio in seguito all'adesione alla matrice ossea degli osteoclasti attivati ed avviene a livello di una cavità poco profonda chiamata *lacuna di Howship*. L'azione delle pompe protoniche vacuolari (V-ATPasi) presenti nel bordo estroflesso della membrana di ciascun osteoclasto determina un'acidificazione dello spazio extracellulare locale che causa la dissoluzione dei cristalli di idrossiapatite ossea. Ne consegue un'esposizione della matrice organica, principalmente costituita da collagene di tipo I. La secrezione da parte degli osteoclasti di enzimi lisosomali, proteasi seriniche, collagenasi e la fosfatasi acida tartratoresistente 5b, porta alla degradazione proteolitica della matrice ossea esposta. L'attività proteolitica degli osteoclasti si realizza principalmente attraverso la catepsina K, una cisteina-proteasi identificata immunostochimicamente nelle vescicole intracellulari localizzate in prossimità del bordo estroflesso della membrana. Le metalloproteinasi di matrice (MMPs) hanno un ruolo fondamentale nel riassorbimento da parte degli osteoclasti, rimuovendo lo strato di collagene dalla superficie dell'osso prima che

il processo di demineralizzazione abbia inizio [15]. Le MMPs maggiormente coinvolte in questi processi sono le collagenasi identificate come MMP 1, 8 e 13, e la loro attività risulta particolarmente indotta in condizioni di infiammazione tissutale.

Riassumendo, il processo di riassorbimento della matrice ossea ad opera degli osteoclasti può essere suddiviso in due distinte fasi: la fase di demineralizzazione, in cui gli osteoclasti secernono sulla superficie dell'osso protoni in grado di liberarne la componente minerale ed il riassorbimento proteolitico della matrice organica esposta.

Il riassorbimento osseo è soggetto ad una fine regolazione da parte di ormoni circolanti e fattori locali. L'effetto dei fattori può essere diretto o mediato da altre cellule ossee: le cellule osteoblastiche possono mediare l'azione di fattori di riassorbimento attraverso il rilascio di sostanze in grado di stimolare l'attività degli osteoclasti; inoltre la contrazione del citoplasma degli osteoblasti che rivestono le superfici ossee può consentire l'accesso degli osteoclasti alla matrice, in risposta a stimoli ormonali (16). Anche fattori chemiotattici svolgono un ruolo importante nel richiamare nuove cellule osteoclastiche nella sede di riassorbimento.

Per quanto riguarda la regolazione di tipo ormonale, gli osteoclasti sono le uniche cellule dell'osso a possedere i recettori per l'ormone *calcitonina*, prodotto dalle cellule parafollicolari (o cellule C) della tiroide. La calcitonina antagonizza l'azione del paratormone: inibisce infatti il riassorbimento dell'osso, inducendone il distacco degli osteoclasti, e determina in questi la scomparsa dell'orletto increspato e l'inibizione del metabolismo. Il recettore per la calcitonina è già espresso dai precursori circolanti degli osteoclasti e la sua evidenziazione può essere un valido metodo per l'identificazione di tali cellule.

Un ruolo fondamentale nella differenziazione e nell'attività delle cellule osteoclastiche è oggi attribuito al sistema osteoprotegerina (OPG)/RANKL/RANK (17,18,19).

RANKL è una molecola in grado di legare un recettore (RANK) espresso sulle membrane cellulari dei precursori osteoclastici, promuovendone la differenziazione e la maturazione. OPG è invece una molecola prodotta dalle cellule osteoblastiche che svolge il ruolo di recettore solubile di RANKL, inibendo in tal modo il processo di osteoclastogenesi (20,21,22). Topi knockout per i geni codificanti RANKL e RANK sviluppano un quadro di osteopetrosi caratterizzata da abbondante massa ossea e insufficiente riassorbimento osteoclastico; topi knockout per OPG presentano invece un elevato metabolismo scheletrico e sviluppano un quadro di osteoporosi grave (23). Negli ultimi anni è stato osservato che numerosi fattori locali e ormonali sono in grado di influenzare il processo di osteoclastogenesi e di attività delle cellule osteoclastiche mature, interferendo con il sistema OPG/RANKL/RANK (24).

La degradazione della matrice ossea ha come conseguenza il rilascio di varie proteine, tra cui i fattori di crescita immagazzinati precedentemente durante la formazione di osso. Essi, assieme alle citochine prodotte dagli osteoclasti e da altre cellule, reclutano al sito di lesione gli osteoprogenitori che si differenziano in osteoblasti. Il differenziamento osteoblastico richiede la partecipazione di numerosi fattori di crescita locali, fra cui le BMPs, TGF- β), e IGFs, tipo I e II (25,26,27).

Anche gli osteoblasti sono in grado di innescare il riassorbimento della matrice ossea, sia indirettamente, in quanto, come precedentemente detto, producono fattori solubili in grado di attivare gli osteoclasti (in particolare RANKL ed M-CSF), sia direttamente, poiché secernono enzimi proteolitici capaci di scindere i componenti della matrice organica dell'osso. Tra gli enzimi secreti vi è la *collagenasi*, rilasciata sotto forma di *procollagenasi* inattiva. Gli osteoblasti producono l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA), che agisce su una proteasi ad ampio spettro, la *plasmina*, presente nel plasma sanguigno come precursore inattivo (plasminogeno). La plasmina opera il clivaggio proteolitico della procollagenasi, trasformandola in collagenasi. La collagenasi osteoblastica agisce rimuovendo lo strato di tessuto osteoide non mineralizzato che riveste la superficie dell'osso, consentendo così agli osteoclasti di aderire alla matrice mineralizzata e dissolverla.

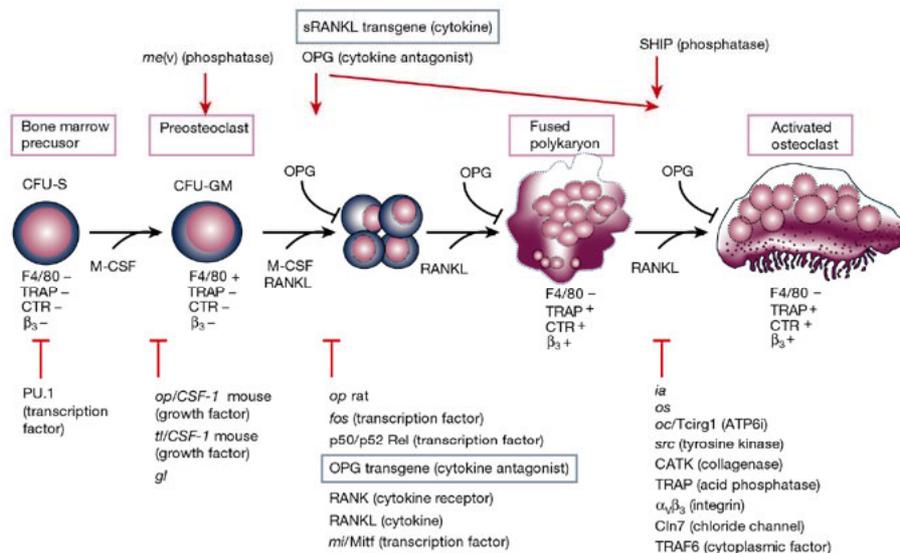


Figura 8. Osteoclastogenesi. (Da: Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. 'Osteoclast differentiation and activation'. Nature 2003;423:337-42).

FISIOPATOLOGIA DEL RIMODELLAMENTO OSSEO

L'efficienza della funzione meccanica dello scheletro è garantita dal rimodellamento osseo che, come descritto in precedenza, consiste in una continua e coordinata sequenza di rimozione e deposizione di tessuto osseo, in cui le cellule principalmente responsabili sono gli osteoclasti, deputati al riassorbimento osseo, e gli osteoblasti, deputati alla formazione della matrice ossea e alla sua mineralizzazione. La contemporanea presenza di osteoclasti ed osteoblasti è necessaria per attivare il ciclo di rimodellamento osseo e, in condizioni normali, la formazione ossea avviene solo nei siti in cui l'osso è stato riassorbito.

L'accelerazione del rimodellamento osseo associata ad un incremento dell'attività riassorbitiva degli osteoclasti, causa condizioni morbose caratterizzate da aumentato rischio di frattura conseguente alla riduzione della massa ossea (Figura .

Osteoporosi

Epidemiologia

Dal punto di vista epidemiologico, l'osteoporosi rappresenta la più diffusa malattia da alterato rimodellamento osseo: in Europa, Stati Uniti e Giappone colpisce circa 75 milioni di persone, in particolare donne in post-menopausa (28). Negli Stati Uniti e nell'Unione Europea circa il 30% delle donne in post-menopausa presentano osteoporosi e si stima che più del 40% avranno una frattura durante il resto della loro vita (29,30). L'incidenza della malattia aumenta con l'età sino ad interessare la maggior parte della popolazione oltre l'ottava decade di vita. Si stima che nel 2009 in Italia vi fossero circa 3,5 milioni di donne ed 1 milione di uomini affetti da osteoporosi e il "life-time risk" di andare incontro ad una tipica frattura osteoporotica al polso, ai corpi vertebrali o al femore prossimale era del 15% circa per ogni sito specifico e del 40% per tutti i siti. Nella popolazione italiana oltre i 50 anni d'età il numero di fratture di femore è superiore alle 80.000 unità/anno. Alterazioni morfologiche vertebrali sono state riscontrate in oltre il 20% dei soggetti con età superiore ai 65 anni in entrambi i sessi. Inoltre, le fratture osteoporotiche hanno importanti implicazioni sociali ed economiche oltre che sanitarie: tra gli anziani esse rappresentano una delle maggiori cause di mortalità, la cui incidenza è sostanzialmente sovrapponibile a quella per ictus e carcinoma mammario e 4 volte superiore a quella per carcinoma endometriale. Il 50% delle donne con frattura di femore presenta infine una consistente riduzione del livello di autosufficienza e, in circa il 20% dei casi essa richiede un ricovero in lungodegenza. Per questi motivi l'osteoporosi costituisce un importante problema di Sanità Pubblica (31).

Classificazione

Osteoporosi primaria: esistono tre tipi di osteoporosi primaria.

Osteoporosi idiopatica: rara, ma si verifica in bambini o in giovani adulti di entrambi i sessi con normali funzioni gonadiche.

Osteoporosi di tipo I (osteoporosi postmenopausale) si verifica tra i 51 e i 75 anni. Sebbene sei volte più comune nelle donne, essa si verifica anche negli uomini dopo castrazione o con bassi livelli di testosterone sierico ed è direttamente correlata alla perdita di funzione gonadica. La perdita di estrogeni conduce a elevati livelli sierici di interleuchina-6 e forse di altre citochine, che si pensa portino a un aumento del reclutamento e dell'attività di preosteoclasti nell'osso trabecolare. **Osteoporosi di Tipo II** (osteoporosi involutiva o senile) è associata con i normali processi di invecchiamento, con un graduale declino del numero e dell'attività degli osteoblasti e non primariamente con un aumento dell'attività degli osteoclasti. Si verifica principalmente in persone > 60 anni ed è due volte più frequente nelle donne rispetto agli uomini. Il tipo II colpisce sia l'osso trabecolare che quello corticale, dando luogo spesso a fratture del collo del femore, vertebrali, dell'omero prossimale, della tibia prossimale e pelviche. Essa può essere provocata dalla riduzione di sintesi di vitamina D che si verifica con l'invecchiamento o da una resistenza all'azione di questa stessa vitamina (probabilmente attraverso una diminuzione o una non responsività dei recettori della vitamina D in alcuni pazienti). Nelle donne più anziane si possono spesso verificare contemporaneamente sia l'osteoporosi di tipo I che di tipo II.

Osteoporosi secondaria: è responsabile di < 5% di tutti i casi di osteoporosi. Le cause possono includere malattie endocrine (p. es., ipersurrenalismo, iperparatiroidismo, ipertiroidismo, ipogonadismo, iperprolattinemia, diabete mellito), farmaci (p. es., corticosteroidi, etanolo, dilantina, tabacco, barbiturici, eparina) e condizioni varie (p. es., immobilizzazione, insufficienza renale cronica, epatopatia, sindrome da malassorbimento, broncopneumopatia cronica ostruttiva, artrite reumatoide, sarcoidosi, patologie neoplastiche maligne, prolungata assenza di gravità come si verifica nei voli spaziali).

Fattori di rischio

L'osteoporosi è una malattia scheletrica sistemica multifattoriale caratterizzata da una progressiva riduzione della resistenza ossea e da una contemporanea alterazione della microarchitettura scheletrica che si accompagnano ad aumento del rischio di frattura (Figura 9).

I fattori di rischio per l'insorgenza di osteoporosi sono molteplici: alla patogenesi concorrono fattori costituzionali, genetici e ambientali.

La resistenza ossea risulta dall'integrazione di due elementi principali: la densità minerale ossea (bone mass density, BMD) e la qualità dell'osso. La BMD è determinata a sua volta dal picco di massa ossea raggiunto alla maturità e dall'entità della perdita di massa ossea, il primo influenzato principalmente da fattori genetici, dall'assunzione di calcio con la dieta e dall'esercizio fisico, la seconda dalla perdita degli ormoni sessuali, dal disuso, e dal deficit di calcio e di vitamina D.

La qualità dell'osso, invece, è legata alla propria microstruttura, alla velocità del turnover osseo e al progressivo accumulo di microtraumi.

L'osteoporosi può dunque essere la conseguenza non solo della perdita di massa ossea legata alla caduta del tasso estrogenico e/o all'invecchiamento, ma anche di un basso picco di massa ossea raggiunto alla maturità.

Per ciò che concerne i fattori genetici, si ritiene che la variabilità della massa ossea possa essere spiegata dalla componente genetica per un 30-80% (32,33,34). Tra i geni i cui polimorfismi sono stati studiati nell'ambito dell'eziopatogenesi dell'osteoporosi si ritrovano i geni codificanti il collagene di Tipo I (COL1A1), il recettore estrogenico (ER) e il recettore della vitamina D (VDR). Le differenze etniche nella BMD, nella prevalenza di osteoporosi e nel rischio di fratture, che vedono le donne di colore meno predisposte a tali condizioni rispetto a quelle caucasiche e asiatiche, fanno presupporre che il ruolo dei fattori genetici sia rilevante.

I fattori ambientali, invece, comprendono l'attività fisica, le abitudini alimentari, il consumo di alcool, tabacco e caffè nonché l'assunzione di farmaci che interferiscono col metabolismo fosfocalcico. A tali fattori, si aggiungono quelli anagrafici e costituzionali, quali il genere, l'età e la costituzione fisica.

Molti di questi fattori di rischio sono strettamente connessi ad un aumento dello stress ossidativo, condizione tipica di numerose patologie multifattoriali e causa di gravi danni a proteine, lipidi ed acidi nucleici nonché di morte cellulare. È stato evidenziato come anche un accumulo di Fe nel tessuto osseo sia caratteristico dell'osteoporosi, nonché correlato anche all'invecchiamento stesso. I metalli di transizione, come il Fe, generano radicali liberi altamente reattivi tramite reazione di Fenton coinvolti nel perpetuarsi di meccanismi di stress ossidativo (35,). Questo fenomeno ha un impatto negativo sul metabolismo osseo determinando un'inibizione della formazione degli osteoblasti che comporta un decremento della sintesi di nuovo tessuto.

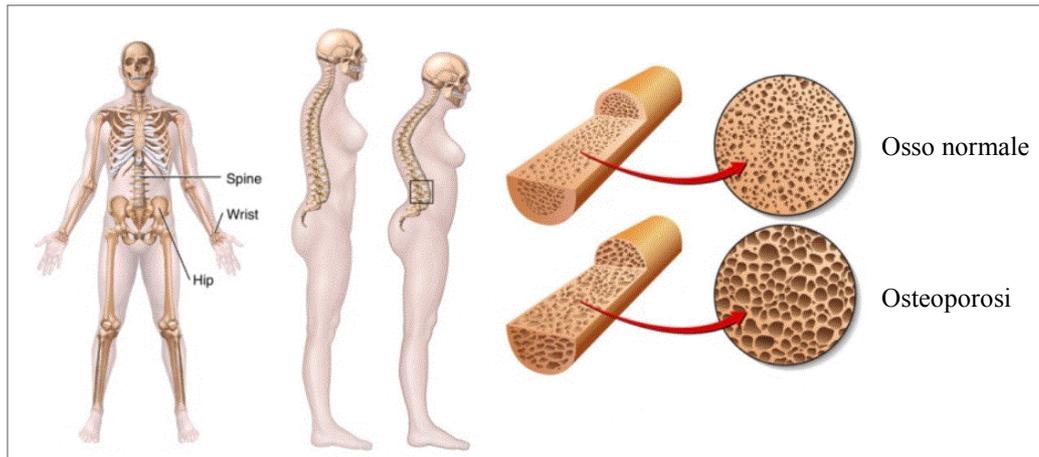


Figura 9. Osteoporosi.

Diagnosi

Dal punto di vista diagnostico, attualmente non sono disponibili tecniche che consentano di valutare completamente la resistenza dell'osso; la misurazione della BMD viene spesso utilizzata a tale scopo e si stima che sia responsabile del 70% della resistenza dell'osso.

L'OMS ha definito come osteoporosi un valore della BMD al di sotto di -2.5 deviazioni standard rispetto al valore medio di una popolazione giovane di riferimento (36,37). Essendo però una classificazione derivata dai dati ottenuti in un gruppo di donne di razza caucasica in periodo post-menopausale, essa è da considerarsi comunque una definizione operativa che indica soltanto di quanto è ridotta la massa ossea, ma che non consente né di identificare il tipo di osteoporosi (primitiva o secondaria), né di fare una diagnosi differenziale con altre osteopatie metaboliche quali l'osteomalacia.

Prevenzione e trattamento farmacologico

Fondamentale risulta la prevenzione dell'osteoporosi, basata sia su interventi non farmacologici (adeguato apporto di calcio e vitamina D con la dieta, attività fisica) sia sull'eliminazione dei fattori di rischio modificabili (fumo, abuso di alcool, rischi ambientali di cadute).

Tuttavia, una volta instaurati tutti gli interventi relativi allo stile di vita e alle necessarie supplementazioni, la terapia farmacologica è quella che permette di prevenire con maggiore efficacia le fratture da fragilità. Il trattamento dell'osteoporosi si avvale oggi di numerosi farmaci anti-osteolitici (che interferiscono cioè con le fasi del processo di riassorbimento del tessuto osseo) e farmaci osteoformativi o anabolizzanti (che stimolano, cioè, l'osteof ormazione). Tra i primi ritroviamo gli estrogeni, i modulatori selettivi del recettore dell'estrogeno (SERM), la calcitonina, e i bisfosfonati che rappresentano il trattamento di

elezione. Tra i farmaci osteoformativi ritroviamo i peptidi del PTH e i fluoruri. Il ranelato di stronzio agisce invece con un duplice meccanismo di azione, antirassorbitivo e anabolizzante (38).

Gli **estrogeni**, da soli o in associazione con i progestinici, prevengono la perdita di massa ossea in menopausa e le fratture da fragilità, incluse quelle di femore, attraverso un meccanismo di inibizione del riassorbimento osseo. Tuttavia, tale terapia trova attualmente indicazione soprattutto allo scopo di contrastare la sindrome climaterica in donne fortemente sintomatiche, spesso non ancora osteoporotiche; in questi casi può pertanto essere considerata anche come un intervento di prevenzione primaria dell'osteoporosi. Invece, per la prevenzione delle fratture osteoporotiche, gli estrogeni trovano indicazione approvata solo come trattamento di seconda scelta, nei casi in cui non sia possibile l'impiego di uno degli altri farmaci approvati per il trattamento dell'osteoporosi.

Il **Raloxifene** è classificato come una molecola SERM (*selective estrogen receptor modulator*) in quanto in grado di interagire con i recettori estrogenici, ma con azione diversa nei vari tessuti (es. estrogenica sull'osso ed antiestrogenica sul tessuto mammario). Come gli estrogeni, il Raloxifene agisce inibendo il riassorbimento osseo. Previene la perdita di massa ossea in donne in postmenopausa e riduce il numero di fratture da fragilità vertebrali e non vertebrali in donne con osteoporosi senza fratture e con fratture. Nonostante sia efficace nel prevenire anche il carcinoma mammario invasivo, in Italia il farmaco non si è largamente diffuso in quanto la sua somministrazione è risultata associata ad un effetto di aumento del rischio tromboembolico, il quale rappresenta l'effetto indesiderato più importante.

I **bisfosfonati** sono i farmaci d'elezione nel trattamento dell'osteoporosi. Si tratta di molecole dal tropismo selettivo nei confronti del tessuto osseo mineralizzato e dotate della capacità di inibire il riassorbimento osseo. Tra i bisfosfonati gli aminoderivati quali alendronato, residronato, ibandronato e zoledronato, sono certamente quelli con sicura documentazione di efficacia nel ridurre i rischi di fratture vertebrali e non vertebrali, mentre solo per alendronato, risedronato e zoledronato è stata dimostrata l'efficacia nel prevenire le fratture di femore. Alendronato e risedronato si sono dimostrati efficaci anche nel trattamento dell'osteoporosi indotta da glucocorticoidi. Inoltre, alendronato, risedronato e zoledronato sono i bisfosfonati approvati in Italia per il trattamento dell'osteoporosi maschile. Gli effetti collaterali più importanti in associazione al trattamento con gli aminobisfosfonati sono le lesioni gastroesofagee (somministrazione orale) e l'osteonecrosi delle ossa mascellari.

I **peptidi del paratormone**, PTH 1-34 o teriparatide e PTH 1-84 sono molecole che, a differenza dei farmaci precedentemente descritti, agiscono stimolando la neoformazione

ossea. Entrambi i peptidi sono registrati in Italia per la terapia dell'osteoporosi postmenopausale severa, con fratture vertebrali multiple o incapaci di rispondere alle terapie antiriassorbitive. Entrambe le molecole riducono le fratture vertebrali, ma solo il PTH 1-34 si è dimostrato capace di prevenire le fratture non vertebrali. Il PTH 1-34 è inoltre indicato per il trattamento delle osteoporosi indotte da cortisonici e per l'osteoporosi severa nel maschio. Gli effetti collaterali associati alla loro somministrazione sono principalmente ipercalcemia ed ipercalciuria.

Il **ranelato di stronzio** è un farmaco in grado di indurre uno squilibrio nel processo del rimodellamento osseo a favore della neoformazione ossea. È l'unico farmaco per il quale studi clinici controllati sono stati condotti per un periodo pari a 5 anni. Nonostante lo stronzio, a causa del suo maggiore peso molecolare rispetto a quello del calcio, si accumuli progressivamente nel tessuto osseo nel corso della terapia, è stata comunque dimostrata una correlazione significativa fra BMD e riduzione del rischio di frattura da fragilità in donne in postmenopausa trattate con questo farmaco. L'effetto indesiderato più frequente del ranelato di stronzio è l'intolleranza intestinale (diarrea o stipsi), mentre quello in assoluto più grave, anche se più raro, è la sindrome DRESS (Drug Rush with Eosinophilia and Systemic Symptoms).

OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'efficacia dei trattamenti farmacologici per l'osteoporosi è correlata al grado di aderenza da parte del paziente ai farmaci prescritti, sia in termini di *compliance* (qualità dell'assunzione) che di persistenza (quantità dell'assunzione). Tuttavia, la malattia stessa ed i farmaci attualmente utilizzati per curarla non favoriscono l'aderenza al trattamento. La malattia è cronica e tipica del soggetto anziano ed è asintomatica sino al verificarsi dell'evento fratturativo. In generale i farmaci per la terapia dell'osteoporosi sono costosi, devono essere impiegati cronicamente e prevedono modalità di assunzione relativamente complesse, e generano con certa frequenza effetti collaterali. In particolare, gli effetti collaterali che più frequentemente si associano al trattamento con i bisfosfonati per via orale sono quelli a carico dell'apparato gastrointestinale (gastrite, esofagite e ulcere esofagee), soprattutto in persone con reflusso gastroesofageo o alterata motilità esofagea e che non seguono in maniera corretta le indicazioni sulla modalità di assunzione. Più recentemente ha ottenuto l'indicazione per l'osteoporosi postmenopausale e maschile anche lo zoledronato, di cui è dimostrata l'efficacia antifratturativa a livello vertebrale e femorale. L'utilizzo di questo farmaco, a dosaggi maggiori nei pazienti neoplastici, è associato ad un aumentato rischio di osteonecrosi della mandibola. Sintomi similinfluenzali possono verificarsi invece in seguito ad assunzione endovenosa di bisfosfonati, e, più raramente, dopo la somministrazione mensile di bisfosfonati per via orale.

Pertanto, il limite principale delle attuali terapie per l'osteoporosi è rappresentato da una scarsa aderenza al trattamento. La possibilità di disporre di trattamenti alternativi per l'osteoporosi che siano oltre che efficaci anche somministrabili con formulazioni e posologie diverse da quelle dei farmaci convenzionali, potrebbe migliorare l'aderenza alla terapia, incidendo positivamente sugli esiti clinici della malattia e quindi anche sui costi di gestione del paziente a rischio di frattura (39).

L'obiettivo prioritario dello studio è stato quello di verificare l'attività anti-osteoclastica di molecole di origine vegetale e sintetica come potenziali terapeutici nella cura di malattie caratterizzate da un incremento del riassorbimento osseo. A tale scopo, la ricerca è stata suddivisa in due studi indipendenti:

I. STUDIO DI MOLECOLE BIOATTIVE NATURALI PER LA TERAPIA DI MALATTIE DA AUMENTATO RIASSORBIMENTO OSSEO

Diversi studi sperimentali hanno attribuito a piante comunemente utilizzate a scopo curativo nella medicina tradizionale ayurvedica proprietà anti-proliferative e pro-apoptotiche.

Tali proprietà appaiono potenzialmente sfruttabili anche nell'ambito del trattamento delle malattie da alterato rimodellamento osseo, alla base delle quali, come ampiamente descritto in precedenza, si ha un incremento dell'attività degli osteoclasti rispetto a quella degli osteoblasti. Pertanto, scopo di questo studio è stato quello di effettuare uno screening dell'efficacia anti-osteoclastica di decotti ottenuti da quattro piante della medicina ayurvedica, selezionate sulla base delle proprietà sopradescritte: *Asparagus racemosus*, *Emblica officinalis*, *Hemidesmus indicus* e *Rubia cordifolia*.

II. STUDIO DI MOLECOLE BIOATTIVE SINTETICHE PER LA TERAPIA DI MALATTIE DA AUMENTATO RIASSORBIMENTO OSSEO

Come riportato precedentemente, i bisfosfonati sono i farmaci d'elezione per il trattamento delle malattie da aumentato riassorbimento osseo. Tuttavia, gli elevati costi dei farmaci e gli effetti collaterali legati alla loro somministrazione determinano una scarsa aderenza al trattamento e ne condizionano pertanto l'efficacia. Scopo di questo studio è stato la valutazione del potenziale anti-osteoclastico di bisfosfonati chimicamente innovativi, potenzialmente meno tossici e sintetizzati con strategie catalitiche semplificate ed ecocompatibili, in modo da ridurre notevolmente i costi di produzione. In particolare, sono state verificate l'attività citotossica ed antiosteoclastica dei composti. I risultati sono stati considerati raggiunti qualora al termine delle sperimentazioni fossero identificati BP di nuova sintesi non citotossici e capaci di conservare almeno il 90% della capacità dei substrati di base di inibire il riassorbimento osseo.

Entrambi gli studi sulle molecole naturali e sintetiche sono stati condotti *in vitro* ed orientati sulle seguenti analisi:

- *Analisi del potenziale citotossico.* A monte della valutazione dell'efficacia farmacologica, è stato effettuato uno screening della citotossicità dei composti in esame, allo scopo di individuare le dosi non citotossiche da selezionare per il successivo step di valutazione.
- *Analisi dell'attività anti-osteoclastica.* Sono stati approfonditi i meccanismi d'azione delle molecole in esame ed il loro effetto anti-osteoclastico è stato messo a confronto con quello dei bisfosfonati convenzionalmente utilizzati in campo clinico per il trattamento delle malattie da aumentato riassorbimento osseo. In particolare, è stata indagata la loro capacità di inibire l'osteoclastogenesi, di

indurre l'apoptosi osteoclastica e, nello studio condotto sui bisfosfonati di nuova sintesi, di inibire l'attività osteoclastica di degradazione del collagene umano di tipo I.

- *Analisi della tossicità su precursori osteogenici.* Nello studio condotto sulle piante della Medicina tradizionale ayurvedica, è stata effettuata una valutazione dell'attività dei decotti sulla proliferazione di precursori osteogenici (colture primarie di Mesenchymal stem cell, MSC).

1. MOLECOLE BIOATTIVE NATURALI PER LA TERAPIA DI MALATTIE DA AUMENTATO RIASSORBIMENTO OSSEO

INTRODUZIONE

APPROCCI TERAPEUTICI ALTERNATIVI: L'IMPORTANZA DELLA MEDICINA TRADIZIONALE

Tutte le pratiche, discipline, e conoscenze mediche antiche, proprie di specifiche culture o gruppi etnici, utilizzate con continuità da tempi remoti e quindi preesistenti alla medicina ufficiale contemporanea costituiscono il *corpus* della medicina tradizionale. La medicina tradizionale è praticata ovunque nel mondo, ma in alcune zone del globo è addirittura più diffusa delle pratiche cosiddette scientifiche.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce le medicine tradizionali come *“un complesso di vari interventi sulla salute, di approcci, conoscenze e credenze che riguardano e includono le piante, gli animali e/o le medicine che utilizzano i minerali, le terapie spirituali, le tecniche manuali e gli esercizi fisici, applicate singolarmente o in associazione tra loro allo scopo di conservare il benessere, così come per trattare, diagnosticare o prevenire le malattie”* (WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005).

Da sempre l'uomo per curarsi e per mantenere lo stato di salute ha attinto dalla natura adattando differenti strategie alimentari e terapeutiche in funzione delle caratteristiche climatiche, fitogeografiche, floristiche e delle peculiari tipologie socio-culturali.

Dal punto di vista farmacologico, la pianta può essere considerata come un laboratorio di sostanze chimiche, talvolta isolate ed utilizzate come tali, in altri casi fonte di materia prima per la produzione di farmaci semisintetici, oppure come base per la produzione di fitoterapici veri e propri, nei casi in cui all'attività biologica dell'estratto concorrano più sostanze in esso presenti (fitocomplesso). Le sostanze di origine vegetale, tuttavia, possono essere anche tossiche, causare gravi interazioni con i farmaci di sintesi assunti contemporaneamente, o essere responsabili di reazioni allergiche. Per tali motivi devono essere sempre utilizzati estratti idonei, qualitativamente controllati, standardizzati nei principi attivi utili. Ciò implica l'acquisizione di conoscenze che, costantemente aggiornate, permettano di identificare piante della medicina tradizionale con profili favorevoli al mantenimento dello stato di salute di un individuo. Tali piante/farmaci delle medicine tradizionali, permanendo per secoli e millenni nelle farmacopee tradizionali sono state selezionate per la loro efficacia e hanno superato sicuramente test di tossicità.

Tuttavia, approcci multidisciplinari che coinvolgano ricercatori dei settori biologico-farmaceutico e medico, sono essenziali per comprendere meglio l'attività biologica e i meccanismi di azione di tutte quelle piante di impiego alimentare e tradizionale, dotate di interessanti proprietà terapeutiche.

LA MEDICINA TRADIZIONALE AYURVEDICA

Tra le forme di medicina tradizionale basata principalmente su piante medicinali, l'Ayurveda è sicuramente tra le più conosciute. L'Ayurveda è comunemente considerata la medicina tradizionale indiana e la sua origine risale ad un lontano passato. Da un punto di vista etimologico, Ayurveda significa "conoscenza completa della vita". Deriva dal sanscrito Ayus, che significa "vita" e Veda, vale a dire "conoscenza". Tale scienza ha le sue origini nei Veda. Questi rappresentano una forma di conoscenza orale tramandata di generazione in generazione e successivamente organizzata in forma scritta, che rappresentano, senza ombra di dubbio, la più imponente raccolta letteraria dell'antichità. I testi base della medicina ayurvedica sono la Caraka-Samhita, la Susruta-Samhita, e l'Astahngahrdaya di Vāgbhata. La trilogia che comprende la Caraka Samhita, la Susruta Samhita e gli Astanga di Vāgbhata è nota universalmente come Brhat Trayi, vale a dire la trilogia più antica, il fondamento letterario della medicina ayurvedica. Alla trilogia più antica segue la trilogia minore, ovvero la più recente, il Mādhava Nidāna, la Śārṅgadhara Samhita e il Bhāvaprakāśa chiamata Laghu Trayi.

Nel complesso l'Ayurveda si divide in 8 branche principali: medicina interna, chirurgia, chirurgia sovraclavicolare, ginecologia, tossicologia, psichiatria, geriatria e *vajikarana* ovvero afrodisiaci. La tossicologia, o Agadatantra, è una branca particolarmente interessante come fonte di informazioni per l'identificazione di piante di interesse farmaceutico.

La scelta di eseguire uno studio sulle piante in uso nella medicina ayurvedica è basata su tre importanti considerazioni legate alle caratteristiche della popolazione che le utilizza.

Per prima cosa la popolazione che si intende indagare risiede in una regione ben diversificata floristicamente, come per esempio la foresta pluviale, in cui sono maggiormente diffusi gli endemismi. Questa diversità aumenta notevolmente il numero delle piante disponibili, e con esso aumenta anche la probabilità che le piante contenenti molecole farmacologicamente attive, si trovino effettivamente in uso.

La popolazione deve essere rimasta nello stesso territorio per molte generazioni. I gruppi che risiedono da lungo tempo in un luogo, hanno presumibilmente avuto maggiori opportunità

di esaminare e sperimentare la flora locale. In base a questo principio, in India, ad esempio, le popolazioni indigene, residenti sul territorio da migliaia di anni, costituiscono un oggetto di studio migliore rispetto ai coloni di origine europea.

Infine, la cultura deve possedere una tradizione. I guaritori devono trasmettere le loro conoscenze botaniche di generazione in generazione, per mezzo dei loro apprendisti. L'impiego costante per millenni di una data specie fornisce informazioni simili a quelle che vengono ottenute da sperimentazioni cliniche su larga scala. Inoltre, queste informazioni non risentono di coinvolgimenti politico-economici e degli interessi dei mercati farmaceutici. Questo uso continuo, per tempi prolungati, permette di identificare sia le piante medicinali più attive, sia quelle troppo tossiche fornendo anche una sorta di farmacovigilanza sull'efficacia e la sicurezza del prodotto. [40,41].

Formulazioni farmaceutiche tipiche della medicina ayurvedica

I prodotti medicinali ayurvedici si caratterizzano per l'uso di droghe vegetali in forme farmaceutiche semplici come polveri, infusi, decotti o compresse, ma spesso estremamente elaborati nei costituenti. Una caratteristica dei preparati ayurvedici è infatti quella di essere composti sia da singoli costituenti chimici sia da loro miscele, la cui preparazione e posologia è diversificata in relazione al disturbo che si intende trattare e alle caratteristiche psicosomatiche del paziente. I prodotti medicinali che ne risultano arrivano a contenere diverse decine di molecole miscelate e questo rappresenta un fattore che ne complica considerevolmente il controllo di qualità e la standardizzazione.

Il principio alla base della preparazione di questi 'kasaayaas' è che la pianta, nel suo insieme o come parte di un fitocomplesso, non può essere concepita come efficace dal punto di vista terapeutico poiché solo alcune delle sue molecole saranno farmacologicamente attive. Pertanto, appare di fondamentale importanza isolare le componenti bioattive della pianta. Il solvente universalmente utilizzato ai fini estrattivi è l'acqua e, dato che il materiale vegetale utilizzato per la preparazione dei farmaci ayurvedici è molto simile al materiale alimentare, le pratiche di cottura come il riscaldamento o l'ebollizione sono spesso utilizzate per l'allestimento delle preparazioni farmaceutiche.

Esistono cinque classiche formulazioni ayurvediche di base: 'Swarasa', ovvero il succo spremuto, 'Kalka', una pasta fine ottenuta dalla macinazione di materiale vegetale fresco, umido o essiccato, 'Kwaatha', il decotto, 'Sheeta' o 'Hima', l'infusione di acqua fredda e 'Faanta', l'infuso di acqua calda.

Il decotto preparato secondo la tradizione ayurvedica

Il decotto ayurvedico si ottiene facendo bollire in acqua il materiale vegetale ridotto in polvere fino a che tutti i principi attivi vengono estratti completamente in acqua. Il liquido mantenuto dopo l'ebollizione viene poi filtrato attraverso un panno di mussola.

Il filtrato così ottenuto viene definito come 'kwaatha', ovvero il decotto. L'ebollizione del materiale vegetale in acqua garantisce l'isolamento della componente idrosolubile. La quantità di acqua da aggiungere e da conservare dopo l'ebollizione varia da pianta a pianta. Secondo alcuni esperti, qualunque sia il volume di acqua aggiunta, i $\frac{3}{4}$ di questo volume deve evaporare, mentre il residuo sarà quello destinato alla conservazione e all'uso terapeutico. Secondo Saarangadhara, studioso del XIV secolo e autore del famoso manuale di pratiche ayurvediche 'Sārangadharasamhita', si dovrebbe aggiungere una quantità fissa di sedici parti di acqua e, in proporzione, di materiale vegetale in polvere, e conservare, in seguito a bollitura, la metà del volume originario di acqua per il consumo da parte del paziente (42).

La dose consigliata di 'kwaatha' è di 80 ml. Additivi, come i semi di cumino, sostanze caustiche, sale, miscela di zenzero, pepe nero, possono essere aggiunti, nella misura di 3 g, a seconda delle esigenze curative. Inoltre, zucchero e miele, in diverse concentrazioni, vengono aggiunti ad una dose di decotto a seconda della malattia da trattare.

L'ampia variabilità riscontrabile nelle diverse pratiche curative indica chiaramente che i maestri antichi erano a conoscenza dell'esistenza di differenze individuali nella manifestazione della malattia e nella risposta del soggetto alla terapia e quindi dell'importanza della messa a punto di un corretto dosaggio e di un'opportuna formulazione farmacologica che tenesse conto di tale soggettività.

Asparagus racemosus

Generalità

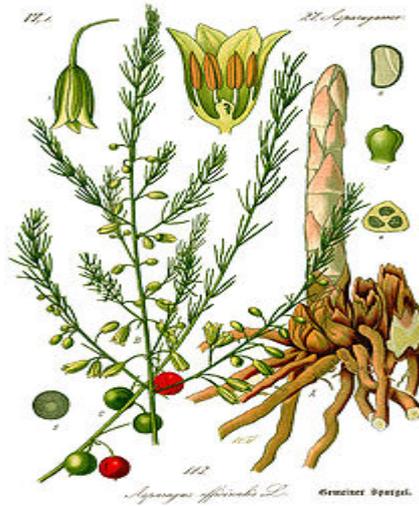


Figura 1. Immagine rappresentativa della pianta.

Asparagus racemosus (famiglia Asparagaceae; Liliaceae), comunemente detto “Shatavari” in lingua Hindi, è un’importante pianta medicinale che cresce nelle zone tropicali e subtropicali dell’India.

La letteratura ayurvedica classica ha da sempre attribuito agli estratti della radice di *Asparagus racemosus* diversi effetti terapeutici quali quello emolliente, rinfrescante, tonico, afrodisiaco, diuretico, rinvigorente, antisetico, galattagogo ed antispasmodico (43). L’impiego di tale pianta nella medicina tradizionale ayurvedica si è dimostrato efficace nella cura di disordini nervosi, infiammazioni, malattie epatiche ed alcune malattie infettive. Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato l’azione benefica esercitata dagli estratti acquosi ed alcolici delle radici di *Asparagus racemosus*, come ad esempio il suo effetto galattagogo, antiepatossico ed immunomodulatore, anche in alcune condizioni cliniche ed in malattie sperimentalmente indotte.

Costituenti chimici

Recenti analisi chimiche hanno dimostrato che i principali fitocostituenti di *Asparagus racemosus* sono delle saponine sferoidali meglio conosciute come Shatavarins I e IV, sarsasapogenine ed asparanina A, B e C. Shatavarin I è un glicoside con tre molecole di glucosio e frazioni di ramnosio legate alla sarsasapogenina (Figura 2, I), mentre Shatavarin IV è un glicoside della sarsasapogenina recante due molecole di ramnosio ed una molecola di glucosio. Le sarsasapogenine e Shatavarins I-IV sono presenti nelle radici, nelle foglie e nei

frutti delle specie di *Asparagus*. Altri composti attivi come quercetina, rutina e iperoside si trovano nei fiori e frutti, mentre glucuronide diosgenina e quercetina-3-glucoronide sono presenti nelle foglie (44, 45). Studi effettuati da Sekine et al. (46) hanno condotto all'isolamento ed alla caratterizzazione di un alcaloide policiclico di *Asparagus racemosus* detto "Asparagamina" (Figura 2, IV). In seguito, si è proceduto all'isolamento, a partire da estratti etanoliche delle radici della pianta, di un nuovo derivato del 9,10-dihydrophenanthrene, detto "Racemosol" (Figura 2, III) (47).

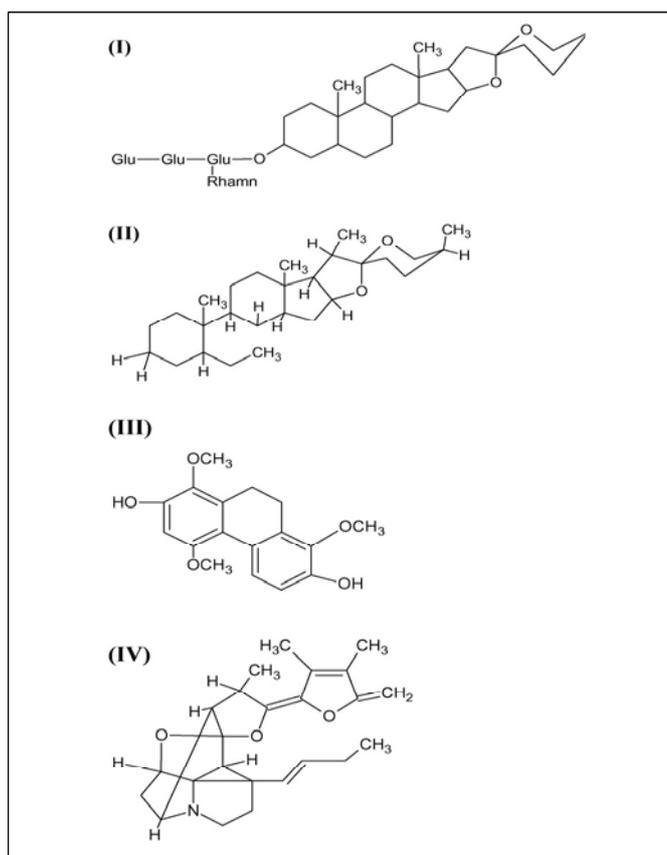


Figura 2. Principi attivi di *Asparagus racemosus*: Shatavarin I (I), Sarsasapogenina (II), Racemosol (III) e Asparagamina (IV).

Proprietà farmacologiche

Effetto gastrointestinale

Il liofilizzato prodotto a partire dalla radice di *Asparagus racemosus* è da sempre impiegato nella medicina tradizionale ayurvedica per curare la dispepsia. La sua somministrazione orale, infatti, stimola lo svuotamento gastrico negli individui sani e la sua azione sembra essere sovrapponibile a quella del metoclopramide sintetico, antagonista della

dopamina (48). Inoltre, è stato dimostrato che il succo di radice fresca di *Asparagus racemosus* è in grado di esercitare un effetto curativo sui pazienti affetti da ulcera duodenale (49). *Asparagus racemosus* esercita anche un'azione protettiva sulla mucosa gastrica nelle ulcere indotte da pentagastrina e carbacolo, riducendo in modo significativo sia la gravità sia l'incidenza della malattia. Singh et al hanno dimostrato che tale pianta allevia tempestivamente e costantemente il dolore e la sensazione di bruciore così come altri sintomi dispeptici tipici dell'ulcera duodenale (50).

Numerose ipotesi sono state avanzate circa il possibile effetto gastro-protettivo che rende *Asparagus racemosus* particolarmente indicato nella cura delle ulcere. Anzitutto, sembra che l'impiego di tale pianta medicinale sia in grado di prolungare la vita delle cellule della mucosa gastrica, aumentare la secrezione e la viscosità del muco e rafforzare la barriera mucosale, riducendo in tal modo la retrodiffusione degli ioni H⁺ nella mucosa. Inoltre, essa può formare, assieme al muco, un complesso capace di proteggere la lesione ulcerosa dagli effetti corrosivi e proteolitici della pepsina ed è in grado di esercitare un'azione citoprotettiva simile a quella delle prostaglandine. Un altro possibile meccanismo di protezione gastrica messo in atto da *Asparagus racemosus* potrebbe essere la sua capacità di legarsi alla pepsina e agli acidi biliari, inattivandoli. È importante sottolineare che l'effetto antiulcerogenico di *Asparagus racemosus* non è stato dimostrato esclusivamente in campo clinico: De et al. hanno condotto studi *in vivo* su coniglio in cui è stata dimostrata l'induzione della contrazione della muscolatura liscia duodenale da parte di diversi estratti dalla radice di *Asparagus* senza che tale azione riuscisse a compromettere il movimento peristaltico (51). Questo effetto è risultato simile a quello esercitato dall'acetilcolina; inoltre, è stato inibito dall'atropina, suggerendo un meccanismo d'azione colinergico (52).

Effetto galattagogo

L'estratto della radice di *Asparagus racemosus* viene prescritto nella medicina tradizionale ayurvedica per aumentare la secrezione di latte durante l'allattamento. Diversi studi clinici (53) e condotti *in vivo* (54,55) hanno confermato l'effetto galattagogo di questa pianta. Ad esempio, Sabin et al. hanno dimostrato che la somministrazione sistemica di un estratto alcolico di *Asparagus racemosus* in femmine di ratto produceva un aumento del peso delle ghiandole mammarie e del volume del tessuto lobulo-alveolare mammario, probabilmente dovuto all'azione di corticoidi e prolattina rilasciati (56).

Effetto immunomodulatorio

La sepsi intra-addominale, conseguenza di traumi o di interventi chirurgici a livello intestinale, rappresenta la principale causa di mortalità. Le proprietà immunomodulatorie di *Asparagus racemosus* sono in grado di proteggere contro la sepsi indotta sperimentalmente a livello addominale sia nel ratto sia nel topo. È stato dimostrato, infatti, che la somministrazione orale del decotto della radice di *Asparagus racemosus* genera leucocitosi e neutrofilia in associazione ad un aumento dell'attività fagocitaria dei macrofagi e delle cellule polimorfonucleate. Inoltre, la percentuale di mortalità negli animali trattati con *Asparagus racemosus* risultava notevolmente ridotta, mentre il tasso di sopravvivenza era paragonabile a quello del gruppo trattato con una combinazione di metronidazolo e gentamicina (57,58). Non essendo nota un'azione antibatterica della pianta, si ritiene che l'effetto antisetico dimostrato sia da ricondurre alla sua proprietà immunomodulatoria, in grado di alterare la funzione dei macrofagi.

Effetto epatoprotettivo

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'estratto alcolico della radice di *Asparagus racemosus* riduce significativamente i livelli di alanina transaminasi, aspartato transaminasi e della fosfatasi alcalina nei ratti affetti da cirrosi epatica indotta dal trattamento con tetracloruro di carbonio (59). Tali evidenze confermano l'effetto antiepatotossico di *Asparagus racemosus*.

Effetti tossici

Nella medicina ayurvedica, *Asparagus racemosus* è stato descritto come sicuro per l'utilizzo a lungo termine, anche durante la gravidanza e l'allattamento. La somministrazione sistemica di dosi più elevate dell'estratto non ha prodotto alcuna anomalia nel modello di comportamento del topo e del ratto e non ha prodotto mortalità, anche fino a dosaggi orali di 64 mg/ kg (60,61).

Emblica officinalis

Generalità



Figura 3. Immagine rappresentativa della pianta. Frutto (a);

Emblica officinalis rappresenta sicuramente la più comune tra le piante medicinali dell'Ayurveda e numerosissime sono le preparazioni che la contengono. Si tratta di un albero o cespuglio deciduo appartenente alla famiglia delle Euphorbiaceae (62). Il suo sinonimo botanico è *Phyllanthus Emblica*, mentre in sanscrito è meglio conosciuta come *Amla* ed in lingua inglese come *Indian gooseberry* (“ribes indiano”) (63). Cresce nelle zone tropicali e subtropicali del sud-est asiatico, in particolare in Cina, India, Indonesia e nella penisola malese. È sempre stata utilizzata come antinfiammatorio ed antipiretico non solo nella medicina tradizionale ayurvedica ma anche in quella cinese e tibetana. Nella medicina ayurvedica i frutti dell'*Emblica* sono considerati dei “rasayana” (agenti che garantiscono longevità) e da migliaia di anni vengono utilizzati a scopo curativo in moltissimi preparati e per una serie estremamente ampia di malattie. In particolare, i campi di applicazione tradizionali sono quelli delle patologie tumorali, cardiache e vascolari, del diabete, dei disturbi epatici e pancreatici, delle infezioni polmonari. *Emblica officinalis* viene impiegata anche come antiossidante, immunomodulatore, antipiretico, analgesico, citoprotettivo, antitussivo e gastroprotettivo. Inoltre, questa pianta viene utilizzata allo scopo di incentivare e migliorare la memoria, nel trattamento dei disturbi oftalmici e come agente riducente i livelli ematici di colesterolo. *Amla* viene anche usata come antimicrobico e come agente in grado di neutralizzare il veleno dei serpenti. Le foglie in infusione con il fieno greco sono indicate per il trattamento dei problemi intestinali mentre l'essudato dalle incisioni del frutto sono state da sempre utilizzate come collirio nel trattamento delle infiammazioni oculari.

Emblica officinalis è usata in varie forme. Una delle più popolari è rappresentata dal decotto o dall'infusione delle foglie e dei semi. Tuttavia, viene anche preparata sottoforma di liquore, olio essenziale, polvere, pasta e sottaceto. Inoltre, è spesso usata in una combinazione equiparte di erbe indiane (*Terminalia chebula*, *Terminalia belerica*), nota come *Triphala*, dalle proprietà antimutagene, antitumorali, antidiabetiche e detossificanti (64,65). Infine, il *Chyawanprash* è un antico tonico indiano contenente principalmente *Emblica* ed un elevato tasso (34 mg/100 g) di vitamina C: tale supplemento fitoterapico è in grado di ridurre la glicemia postprandiale ed i livelli di LDL (66,67).

Costituenti chimici

Tra i componenti attivi principali del frutto dell'*Emblica* sono stati isolati tannini quali l'emblicanina A e B, la punigluconina e la pedunculagina (Figura 4) che possono prevenire la discinesia tardiva nei ratti, confermandone un effetto protettivo antiossidante anche a livello del Sistema Nervoso Centrale (68).

L'attività antiossidante dell'*Emblica* è dovuta molto più alla presenza delle sostanze tannoidi che alla presenza della vitamina C e comunque la pianta sembra essere da sola più potente della vitamina stessa (69,70). Il contenuto in vitamina C nell'estratto del frutto dell'*Emblica* è pari a 0.12-0.7 % e spesso risulta essere 6-20 volte maggiore rispetto a quello riscontrato nell'arancia che, per contro, ne contiene soltanto lo 0.03-0.05% (71).

I tannini dell'*Amla* possono essere definiti epatoprotettori (esercitano un effetto simile a quello esercitato dalla silimarina), in grado, cioè, di prevenire il danno da sovradosaggio di ferro a livello del fegato in quanto inibitori della lipoperossidazione lipidica (72).

L'attività antiossidante dell'estratto è a lunga durata nel tempo (maggiore durata di quella dell'attività antiossidante della vitamina C, E e del picnogenolo) e questo è dovuto al fatto che la combinazione di tannini a basso peso molecolare contenuti nell'*Amla* formano un sistema antiossidante a 'cascata': sotto ossidazione, l'emblicanina A si trasforma in emblicanina B e, sotto ulteriore stress ossidativo, la forma B produce altri oligomeri che di per sè sono ancora antiossidanti (73).

Nel rizoma dell'*Amla* sono stati isolati altri componenti chiamati filloemblichine (A,B,C), importanti per l'attività antitumorale. Nel frutto, oltre all'acido gallico, sono stati identificati nuovi composti fenolici suoi derivati, come gli esteri in posizione 2-O e 3-O con l'acido L-malico e con l'acido mucico (74). Parte dei composti chimici identificati in *Embllica officinalis* sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

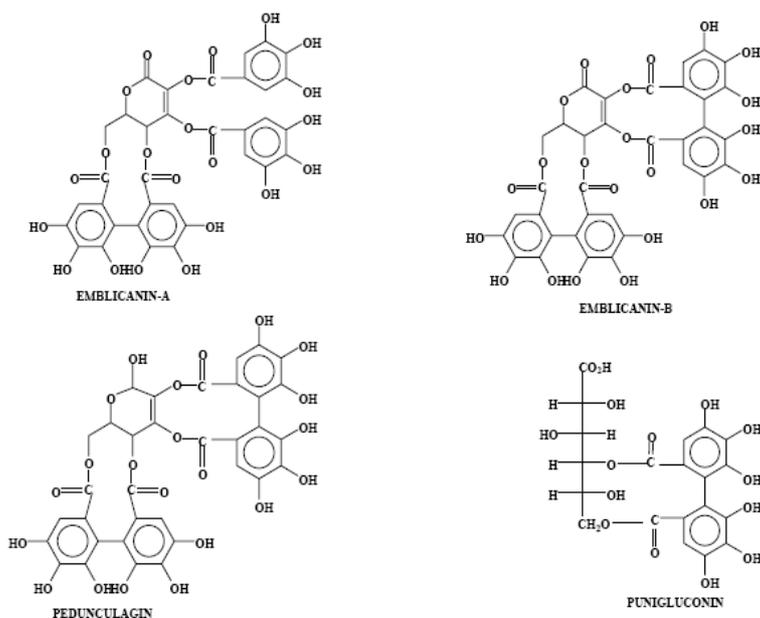


Figura 4. I tannini costituenti dell'*Embllica officinalis*.

| S.No | Componenti chimici |
|------|--------------------|
| 1. | Tannins |
| 2. | Alkaloids |
| 3. | Phenolic compounds |
| 4. | Amino acids |
| 5. | Carbohydrates |
| 6. | Vitamin C |
| 7. | Flavanoid |
| 8. | Ellagic acid |
| 9. | Chebulinic acid |
| 10. | Quercetin |
| 11. | Chebulagic acid |
| 12. | Emblicanin-A |
| 13. | Gallic acid |
| 14. | Emblicanin-B |

| | |
|-----|--------------------|
| 15. | Punigluconin |
| 16. | Pedunculagin |
| 17. | Citric acid |
| 18. | Ellagotannin |
| 19. | Trigallayl glucose |
| 20. | Pectin |

Tabella 1. I principali componenti chimici di *Emblica officinalis*

| S.No | Componenti chimici | Percentuale |
|------|--------------------|---------------|
| 1. | Moisture | 81.2% |
| 2. | Protein | 0.5% |
| 3. | Fat | 0.1% |
| 4. | Mineral matter | 0.7% |
| 5. | Fibre | 3.4% |
| 6. | Carbohydrate | 14.1% |
| 7. | Calcium | 0.05% |
| 8. | Phosphorous | 0.02% |
| 9. | Iron | 1,2mg/100gm |
| 10. | Nicotinic acid | 0.2mg/100gm |
| 11. | Vitamin C | 600 mg/100 gm |

Tabella 2. Composizione percentuale media della polpa di frutta dell'*Emblica officinalis*

Proprietà farmacologiche

Effetto antitumorale

Numerosi studi hanno dimostrato il potenziale chemiopreventivo di *Triphala*, attribuibile, con ogni probabilità, alle proprietà antiossidanti possedute dai tannini e flavonoidi che la costituiscono (75,76). L'effetto citotossico dell'estratto acquoso di *Emblica officinalis* è stato valutato sia in topi affetti da linfoma sia su linee cellulari umane di tumore mammario (MCF-7). La differente risposta delle cellule normali e di quelle tumorali al trattamento *in vitro* con *Triphala* e la regressione tumorale osservata nei topi trattati, dimostrano il suo potenziale antitumorale (77). Inoltre, è stato riportato l'effetto antiproliferativo esercitato da *Emblica officinalis* su cellule tumorali, principalmente connesso alla presenza di acido gallico fra i componenti chimici che la costituiscono (78). Infine, è stato descritto il potenziale di induzione apoptotica della frazione polifenolica di *Emblica officinalis* in linee cellulari umane e murine di carcinoma tramite l'inibizione dell'attività della DNA topoisomerasi I e della cdc25 tirosina fosfatasi (79).

Effetto antidiabetico

È stato osservato un effetto di riduzione dei livelli ematici di glucosio in seguito a somministrazione orale di estratti di *Emblica officinalis* (100 mg/Kg di peso corporeo) in ratti sani e diabetici, già a distanza di 4 ore dal trattamento (80). Inoltre, è stato dimostrato che l'*Emblica* è un potente inibitore naturale dell'aldoso reduttasi, un enzima coinvolto nello sviluppo delle complicanze secondarie del diabete, ne è un esempio la cataratta (81). Pertanto, l'introduzione di *Amla* nella dieta dei pazienti diabetici potrebbe costituire una valida alternativa terapeutica per il trattamento delle complicanze secondarie del diabete, dal momento che molti inibitori sintetici dell'aldoso reduttasi si sono dimostrati attivi *in vitro* ma inefficaci *in vivo*.

Effetto epatoprotettivo

Da tempo immemore, i frutti di *Emblica officinalis* vengono utilizzati nella medicina tradizionale ayurvedica come epatoprotettori (82). Gli estratti di *Phyllanthus emblica* hanno manifestato un effetto epatoprotettivo in ratti in cui era stato indotto un danno epatico da tetracloruro di carbonio (83). Inoltre, uno studio condotto *in vivo* utilizzando un estratto idroalcolico del frutto di *Emblica officinalis* ha dimostrato la sua capacità di ridurre la severità della fibrosi epatica indotta sia dal tetracloruro di carbonio sia dalla tioacetamide e di contrastare gli eventi profibrogenici grazie probabilmente alla sua attività antiossidante e di inibizione del citocromo P450 2E1 (CYP 2E1).

L'azione epatoprotettiva di *Emblica officinalis* è stata riportata anche in uno studio condotto su ratti sottoposti a somministrazione acuta e cronica di tetracloruro di carbonio, in cui è stata dimostrata un'azione riducente i livelli sierici ed epatici dei perossidi lipidici, della glutammato-piruvato transaminasi (GPT) e della fosfatasi alcalina (ALP), oltre che la progressione del danno epatico ad una condizione di fibrosi (84).

Effetto cardioprotettivo

È stato dimostrato che la somministrazione cronica di *Emblica officinalis* nei ratti aumenta i livelli endogeni di antiossidanti, producendo un adattamento del miocardio allo stress ossidativo associato al danno da ischemia-riperfusion (85).

Effetto gastrointestinale

Una formulazione minerale-vegetale della medicina ayurvedica nota come 'Pepticare' e composta da *Emblica officinalis*, *Glycyrrhiza glabra* e *Tinospora cordifolia*, esercita un'attività antiulcerica attribuibile alle sue proprietà antiossidanti (86).

Effetto antiossidante

Diversi studi hanno confermato il potere antiossidante di *Emblica officinalis*.

La somministrazione dell'estratto di etilacetato di *Amla* riduce i livelli di azoto ureico e di creatinina sierica nei ratti anziani. La somministrazione orale di tale estratto sopprime anche l'aumento di espressione dell'inducibile nitric oxide synthase (iNOS) e della ciclossigenasi-2 (COX-2) nell'aorta dei ratti anziani, inibendo l'attivazione di NF-kappaB. Per tale motivo, *Amla* potrebbe rappresentare un potente antiossidante nella prevenzione delle malattie renali associate all'invecchiamento (87). Nell'estratto di etilacetato, l'acido gallico sembra essere il componente chimico in grado di esibire la maggiore attività neutralizzante l'ossido nitrico (88), mentre la vitamina C esercita il 45-70% dell'attività antiossidante di *Emblica officinalis* (89). I tannoidi contenuti nell'*Emblica*, inclusi le emblicanine A e B, la punigluconina e la pedunculagina, hanno un effetto antiossidante accertato sia *in vitro* che *in vivo* (90).

Inoltre, estratti di *Amla* somministrati per via orale a ratti diabetici sono in grado di contrastare la perdita di peso corporeo e la riduzione dei livelli ematici di albumina e dei livelli sierici di adiponectina. Pertanto, *Amla* potrebbe essere utilizzata per combattere lo stress ossidativo e migliorare il metabolismo del glucosio nei pazienti diabetici (91).

Sembra che l'*Emblica* sia anche dotata di un potere depigmentante sulla cute paragonabile a quello dell'idrochinone e, rispetto ad altri schiarenti utilizzati per la cura dell'iperpigmentazione cutanea come l'arbutina e l'acido kojico, sia dotata di una tossicità nettamente inferiore.

La proprietà chelante posseduta dai tannini che la costituiscono, rendono l'*Emblica* un agente preservante la cute dai danni derivanti dall'esposizione a metalli tossici, potenti induttori della generazione di radicali liberi e dello stress ossidativo. Per tale ragione, la pianta viene spesso utilizzata per la preparazione di creme anti-età, come schermante dalle radiazioni solari e, in generale, per prodotti mirati alla cura della pelle (92).

Effetto immunomodulatorio

L'effetto immunomodulatorio esercitato da *Triphala* sulle funzioni dei neutrofili, come l'aderenza e l'attività fagocitaria, è stato indagato in uno studio condotto su ratti albini

immunizzati. Tale studio ha dimostrato che la somministrazione orale della pianta sembra stimolare le funzioni dei neutrofili e contrastare in modo significativo la soppressione, stress indotta, della loro attività (93). L'attività immunomodulatoria di *Emblica officinalis* è stata studiata anche in modelli murini di artrite: l'estratto di tale pianta si è dimostrato in grado di produrre una marcata riduzione dell'infiammazione, dell'edema e dell'immunosoppressione. Questa osservazione conferma il suo potenziale impiego terapeutico come approccio alternativo per il trattamento dell'artrite (94).

Immu-21 è una formulazione ayurvedica contenente estratti di *Emblica*, *Ocimum sanctum*, *Withania somnifera* e *Tinospora cordifolia*. La sua attività immunomodulatoria è stata studiata nei topi con lo scopo di indagarne l'effetto sulla risposta proliferativa di leucociti splenici a mitogeni per le cellule T, quali concanavalina A e fitoemoagglutinina, e al lipopolisaccaride (LPS), mitogeno per le cellule B, tramite un saggio di 'uptake' della [3H]- timidina. Il pretrattamento dei topi con Immu-21 ha stimolato selettivamente la proliferazione dei leucociti splenici in risposta all'LPS e l'attività citotossica in cellule leucemiche umane K 562 (95).

Inoltre, *Emblica officinalis* è in grado di inibire la formazione di radicali liberi indotta dall'esposizione al cromo. Essa inibisce anche l'apoptosi e la frammentazione del DNA indotta dal cromo e contrasta gli effetti immunosoppressivi del cromo sulla proliferazione dei linfociti, addirittura ripristinando la produzione di IL-2 e IFN-gamma (96).

Effetto antipiretico e analgesico

Estratti del frutto di *Emblica officinalis* possiedono potenti proprietà antipiretiche ed analgesiche. Perianayagam et al. (97) hanno infatti osservato che la somministrazione per via intraperitoneale di una singola dose orale di estratto etanologico ed estratto acquoso della pianta (500 mg /kg) produceva una riduzione significativa dell'ipertermia indotta in ratti dal lievito di birra e che entrambi gli estratti inibivano fortemente la risposta al dolore indotta dal trattamento di topi con acido acetico. Questi effetti sono facilmente attribuibili alla presenza, nella pianta, di tannini, alcaloidi, composti fenolici, amminoacidi e carboidrati.

Effetto citoprotettivo, antitussivo e gastroprotettivo

Diversi studi hanno descritto l'effetto citoprotettivo e immunomodulatorio messo in atto da *Emblica officinalis* contro il danno ossidativo indotto dall'esposizione cellulare al cromo. Infatti, l'immunosoppressione indotta dal cromo risulta inibita in seguito a trattamento con

Emblica e l'attività di fagocitosi, tipica dei macrofagi, assieme alla produzione di interferone gamma, risulta ripristinata (98).

L'effetto antitussivo di *Emblica* è stato saggiato in gatti coscienti mediante stimolazione meccanica delle mucose delle aree laringofaringea e tracheobronchiale delle vie respiratorie. L'attività antitussiva di *Emblica* è risultata più efficace di quella esercitata dalla dropropizina, ma meno efficace di quella della codeina classica. Si suppone che a contribuire all'effetto antitussivo dell'estratto secco della pianta vi sia non solo la sua attività antinfiammatoria, antispasmodica ed antiossidante, ma anche il suo effetto sulla secrezione di muco a livello delle vie respiratorie (99).

L'estratto etanologico di *Emblica* è stato studiato per la sua proprietà di inibire la secrezione acida a livello gastrico e per il suo effetto anti-ulcera utilizzando diversi modelli sperimentali *in vivo*, che includono la legatura pilorica dei ratti Shay, il trattamento con indometacina, il modello di ulcera gastrica indotta dallo stress ipotermico ed il trattamento con agenti necrotizzanti. In tutti i modelli sperimentali impiegati, l'estratto di *Amla* ha mostrato attività contrastante la secrezione gastrica, citoprotettiva ed anti-ulcera (100).

Effetto stimolante la memoria

Amla può rappresentare un rimedio utile per la gestione della malattia di Alzheimer grazie ai suoi molteplici effetti benefici quali il miglioramento della memoria e l'inversione del deficit di memoria (101,102).

Effetto sui disturbi oftalmici

Ophthacare è un preparato a base di erbe che funge da collirio. Contiene i costituenti chimici di erbe diverse: *Emblica officinalis*, *Carum copticum*, *Terminalia belerica*, *Curcuma longa*, *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum camphora*, *Rosa damascena* e *Melospumapum*. È stato condotto uno studio clinico trattando con questo collirio pazienti affetti da disturbi oftalmici diversi quali xerosi congiuntivale, congiuntivite, dacriocistite acuta, condizioni degenerative e complicanze oculari post-operatorie (nei casi di pazienti affetti da cataratta). Nella maggior parte dei casi è stato osservato un netto miglioramento. Inoltre, nel corso dello studio non sono stati osservati effetti collaterali ed il collirio è stato ben tollerato dai pazienti. *Ophthacare* potrebbe dunque rivestire un ruolo importante nel trattamento di una vasta serie di disturbi oftalmici infiammatori, infettivi e degenerativi (103).

Effetto di riduzione del colesterolo e della dislipidemia

Amla può essere efficace nel trattamento dell'ipercolesterolemia e nella prevenzione dell'aterosclerosi (104). Essa, infatti, contiene flavonoidi che riducono i livelli lipidici sierici e tissutali in ratti in cui è stata indotta iperlipidemia. Inoltre, è stato dimostrato che *Emblica officinalis* stimola la degradazione e l'eliminazione del colesterolo (105).

Effetto antimicrobico e antimutageno

È stata riportata l'attività antibatterica di *Emblica officinalis* contro *Escherichia coli*, *K. ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. paratyphi A e B* e *Serratia marcescens* (106,107).

Estratti di *Triphala* in acqua, cloroformio e acetone sono stati studiati in ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* allo scopo di valutarne l'effetto antimutageno. Quest'ultimo è stato indagato tramite il test di Ames sia in termini di un'azione contro mutageni diretti, quali il 4-nitro-o-fenilendiammina (NPD) e l'azide di sodio, che contro promutageni come il 2-aminofluorene (2AF).

I risultati derivanti dal trattamento con gli estratti in cloroformio e acetone hanno mostrato un'inibizione della mutagenicità indotta sia da agenti mutageni diretti che da promutageni (108).

Effetto sull'osso

In un loro studio Penolazzi et al. hanno indagato la possibile attività biologica esercitata dagli estratti del frutto di *Emblica officinalis* nel trattamento dell'artrite reumatoide e dell'osteoporosi (109). In particolare, la loro attenzione si è focalizzata sullo studio delle proprietà pro-apoptotiche della pianta su linee primarie di osteoclasti umani. Da tale ricerca è emerso che gli estratti di *Emblica officinalis* sono stati in grado di indurre la morte cellulare programmata di osteoclasti maturi, senza alterare, alle concentrazioni utilizzate (0.5, 5, 50 µg/ml) il processo di osteoclastogenesi. *Emblica officinalis* ha aumentato i livelli di espressione di Fas, gene critico nel processo apoptotico. Esperimenti di gel shift hanno inoltre dimostrato che gli estratti del frutto di questa pianta agiscono interferendo con NF-kB, un fattore di trascrizione coinvolto nella biologia osteoclasti. Tutti assieme, questi dati dimostrano che gli estratti di *Emblica officinalis* competono selettivamente con il legame del fattore di trascrizione NF-kB alle sue specifiche sequenze di DNA bersaglio.

L'induzione apoptotica degli osteoclasti potrebbe rappresentare una strategia importante sia per interferire con le complicanze scheletriche associate all'artrite reumatoide che portano

alla progressiva distruzione articolare, sia per prevenire l'osteoporosi e e ridurne l'incidenza. Pertanto, l'applicazione di estratti *Emblca officinalis* viene consigliata come strumento alternativo adiuvante per la terapia delle patologie ossee.

Hemidesmus indicus

Generalità



Figura 5. Immagine rappresentativa della pianta.

Hemidesmus indicus è una pianta appartenente alla famiglia delle Asclepiadaceae ed è comunemente nota come *Sarsaparilla indiana* e *Anantamul*. È particolarmente diffusa nell'alta pianura del Gange, ad est di Bengala e la Sundribans, e nelle province centrali del sud dell'India e di Ceylon. Si tratta di un arbusto perenne, sottile, nerboruto, talvolta prostrato o semi-eretto. I gambi di questa pianta appaiono snelli, numerosi e dotati di nodi ispessiti. Le foglie semplici, dalla forma molto variabile (possono essere da ellittiche a lineari), bianche in punta e talvolta anche color argento. I fiori sono viola, i frutti appaiono come follicoli sottili, cilindrici, di 10 cm di lunghezza, che tendono ad assottigliarsi al vertice. I semi sono appiattiti, neri, oblungi, di colore bianco argenteo. Le radici sono legnose ed aromatiche, di forma cilindrica e con un diametro variabile da 0,5 a 2 cm, raramente ramificate, marrone scuro esternamente, internamente di colore marrone giallastro.

Le radici di *Hemidesmus indicus* vengono da sempre utilizzate nella Medicina tradizionale ayurvedica come antipiretico, astringente, detossificante ematico, diuretico, refrigerante, tonico (110,111) e trovano impiego anche nella cura di disordini respiratori, malattie cutanee,

dissenteria, sifilide, lebbra, leucoderma, leucorrea, bronchite, asma, disturbi oculari, crisi epilettiche infantili, disordini renali ed urinari, perdita di appetito, disturbi reumatici (112,113). Inoltre, i gambi di *Hemidesmus* vengono utilizzati anch'essi nel trattamento della sifilide e dei disturbi dell'apparato urinario, oltre che nel trattamento di disturbi cerebrali (114).

Composizione chimica

Dalle radici di *Hemidesmus indicus* sono stati isolati emidesmina-1 e -2, vanillina (4-idrossi-3-metossibenzaldeide), lupeolo, β -sitosterolo, α - e β -amirina, alcoli triterpeni tetraciclici, piccole quantità di acidi resinici, acidi grassi, saponine, glicosidi e chetoni (Figura 6). Nel 1968, Subramanian e Nair (115) riportarono la presenza di flavonoidi, in particolare glicosidi flavonici come l'iperoside e la rutina nelle foglie. Le foglie di *Hemidesmus* contengono anche il 2.5 % di tannini (116). I cumarino-lignoidi come l'emidesminina (117), l'emidesmina 1 e l'emidesmina 2 furono isolati da Mandal et al. (118), i quali descrissero per la prima volta i cumarinolignoidi come un nuovo e raro gruppo di composti naturali dalle proprietà citotossiche ed antiepatotossiche.

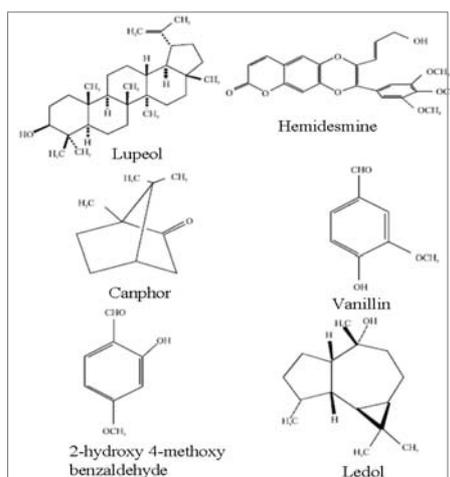


Figura 6. Struttura chimica dei principali componenti chimici presenti in *Hemidesmus indicus*.

Proprietà farmacologiche

Effetto antitumorale

L'attività antitumorale di diversi estratti di *Hemidesmus indicus* è stata indagata da numerosi studiosi. In particolare, è stato effettuato uno studio finalizzato a verificare se il trattamento a lungo termine (16 mesi) con il decotto di una miscela di erbe contenente, oltre che le radici di *Hemidesmus*, anche i semi di *Nigella sativa* ed i rizomi di *Smilax glabra*,

avrebbe potuto inibire sia l'espressione dell'isoforma P della glutatione S-transferasi (GST-P) sia l'insorgenza di tumori spontanei o di cambiamenti istopatologici che conducessero allo sviluppo della massa tumorale (119). In questo studio, condotto in ratti Wistar di sesso maschile, si è potuto constatare che il trattamento prolungato con il decotto in esame forniva protezione contro le alterazioni cancerogene a livello epatico. La citotossicità del decotto e degli estratti vegetali è stata valutata sulla linea cellulare di epatocarcinoma HepG2. I risultati ottenuti dai saggi di citotossicità hanno dimostrato che il decotto esercitava una potente attività citotossica dose-dipendente (120).

L'attività antiproliferativa di estratti di *Hemidesmus indicus* è stata saggiata su diverse linee cellulari tumorali umane. In uno studio condotto da Lampronti et al. l'attività antiproliferativa di *Hemidesmus* è stata valutata sulle linee cellulari eritroleucemiche K562, B-linfoidi Raji, T-linfoidi Jurkat ed HEL (121). In questo studio si è osservato che basse concentrazioni di *Hemidesmus* sono in grado di inibire le interazioni tra i fattori trascrizionali nucleari ed i specifici elementi bersaglio del DNA mimando sequenze che vengono riconosciute dal fattore nucleare kB (NF-kappa B). Si è concluso, pertanto, che gli estratti di *Hemidesmus indicus* possano costituire una fonte di composti antitumorali.

Il potenziale chemiopreventivo di *Hemidesmus indicus* è stato indagato da Sultana et al. (122), i quali scoprirono che questa pianta era in grado di ridurre significativamente la suscettibilità della membrana cutanea microsomiale alla perossidazione lipidica ed alla xantina ossidasi in topi di sesso femminile. Inoltre, il livello di glutatione, l'inibizione dell'attività degli antiossidanti e degli enzimi metabolizzanti di fase II venivano ripristinati in seguito a trattamento con *Hemidesmus*. In sintesi, i dati suggeriscono che questa pianta è un agente chemiopreventivo molto efficace per la pelle in quanto capace di contrastare lo stress ossidativo cutaneo e la progressione tumorale, in modo dose-dipendente.

Effetto epatoprotettivo

Gli effetti dell'estratto etanolo della radice di *Hemidesmus indicus* sono stati esaminati al fine di valutare gli effetti epatoprotettivi della pianta contro gli agenti epatotossici come l'etanolo. A tale scopo i ratti sono stati trattati con etanolo per generare il danno epatico ed è stato osservato che la somministrazione orale di *Hemidesmus* e del suo principio attivo 2-idrossi-4-metossi benzoico ha determinato una riduzione delle concentrazioni plasmatiche delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (thiobarbituric acid reactive substances o TBARS) ed una diminuzione dell'attività degli enzimi epatici rispetto ai controlli. Lo studio ha rivelato una significativa attività inibitoria del principio attivo di *Hemidesmus* nei confronti

del danno epatico causato dalla somministrazione di etanolo nei ratti sperimentali. Esso, infatti, è stato in grado di ridurre la gravità del danno epatico in termini di peso corporeo, marcatori enzimatici epatici, stress ossidativo, stato antiossidante ed alterazioni istologiche.

Anche l'estratto metanolico della radice di *Hemidesmus* possiede una potenziale attività antiepatotossica. Il trattamento di ratti con paracetamolo e tetracloruro di carbonio induce un significativo incremento dei livelli sierici di glutammato-piruvato transaminasi (SGPT), glutammato ossalacetato transaminasi (SGOT), fosfatasi alcalina (ALP), bilirubina totale e diretta. Nei ratti pretrattati con l'estratto metanolico della radice di *Hemidesmus* è stato osservato un aumento dei livelli di questi enzimi che risultava, tuttavia, significativamente inferiore rispetto a quello riscontrato nei ratti trattati con paracetamolo o tetracloruro di carbonio.

Inoltre, la somministrazione orale dell'estratto etanolico della pianta (100mg/kg, per 15 giorni) ha significativamente contrastato l'epatotossicità potenzialmente indotta dal trattamento con rifampicina ed isoniazide in ratti Wistar di sesso maschile.

Effetto anti-iperlipidemia

L'effetto del principio attivo 2-idrossi-4-metossi benzoico (HMBA) isolato da *Hemidesmus indicus* è stato studiato per la sua attività contrastante l'iperlipidemia. L'iperlipidemia indotta dal trattamento con etanolo di ratti Wistar di sesso maschile è risultata significativamente ridotta in seguito a trattamento con l'HMBA (123).

Effetto diuretico e renale

Satoskar et al. (124) hanno riportato in un loro studio che gli estratti alcolici dello stelo e della radice di *Hemidesmus indicus* non presentano un'attività diuretica significativa, mentre gli estratti acquosi generano un incremento del flusso urinario nei ratti ma non nei cani.

L'efficacia dell'estratto derivato dalla radice di *Hemidesmus indicus* nel trattamento della nefrotossicità indotta da aminoglicosidi come la gentamicina è stata indagata in ratti Wistar albini (125). Il trattamento con *Hemidesmus indicus* ha condotto ad una riduzione della nefrotossicità e tale proprietà rende l'utilizzo della pianta una valida terapia aggiuntiva da associare alla somministrazione di aminoglicosidi laterali allo scopo di ridurre la tossicità.

Effetto gastrointestinale

L'effetto anti-ulcera di *Hemidesmus indicus* è stato studiato da Anoop Austin e Jegadeesan (126,127). Dalla loro sperimentazione è emerso che le radici della pianta raccolte

durante la stagione di fioritura risultavano più efficaci rispetto a quelle raccolte durante la stagione vegetativa e che *Hemidesmus* agisce esercitando un effetto mucoprotettivo per mezzo dell'inibizione selettiva della prostaglandina PGF_{2α}. Tale effetto risulta inoltre paragonabile a quello dei farmaci d'elezione per il trattamento dell'ulcera, come la ranitidina e l'omeprazolo.

Effetto antiossidante

L'estratto metanolico della radice di *Hemidesmus indicus* ha dimostrato proprietà antiossidanti in diversi modelli sperimentali *in vitro* ed *in vivo* (128). In particolare, esso è in grado di neutralizzare il 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ed i radicali superossidi, inibire la perossidazione lipidica di omogenati di fegato e l'emolisi indotta dal trattamento con fenilidrazina, confermando la sua azione di stabilizzante della membrana.

In un loro studio, Mary et al. (129) hanno dimostrato che l'estratto metanolico della radice di *Hemidesmus* inibisce la perossidazione lipidica ed esercita un'attività neutralizzante i radicali idrossile e superossido *in vitro*.

Effetto anti-infiammatorio

Dutta et al. (130) hanno scoperto che *Hemidesmus indicus* esibisce un'attività anti-infiammatoria sia nelle infiammazioni acute che nelle infiammazioni croniche, come rivelato dall'inibizione significativa dell'infiammazione sperimentalmente indotta nei ratti dal trattamento con carragenina, bradichinina ed S-idrossi tiptamina. Tuttavia, *Hemidesmus* risultava meno efficace del fenilbutazone o del betametasona nel contrastare il granuloma indotto nei ratti e addirittura inattivo nell'infiammazione indotta dal trattamento con il destrano.

Effetto antinocicettivo

L'estratto etanolico della radice di *Hemidesmus indicus* è stato studiato da Verma et al. (131) per un possibile effetto antinocicettivo nei topi. In questo studio è stato osservato che la somministrazione orale dell'estratto ha esercitato un effetto antinocicettivo dose-dipendente in tutti i modelli di nocicezione indagati; *Hemidesmus* si è inoltre rivelato in grado di bloccare sia il dolore neurogenico che quello infiammatorio e l'attività nocicettiva era comparabile a quella riscontrata nel trattamento con il farmaco di riferimento. Si ritiene che l'attività antinocicettiva di *Hemidesmus* sia attribuibile al suo contenuto in triterpeni, flavonoidi e steroli.

Rubia cordifolia

Generalità

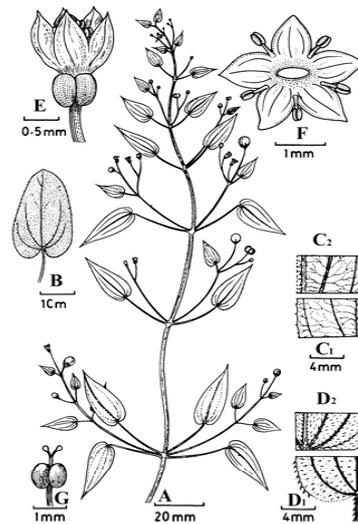


Figura 7. Immagine rappresentativa della pianta. Foglie (B), superficie superiore ed inferiore delle foglie (C₁, C₂, D₁, D₂), fiori (E), corolla sezionata per mostrare gli stami (F), carpello (G).

Rubia cordifolia, anche nota come ‘*Manjishta*’, è una pianta rampicante erbacea perenne, dai rami e dagli steli quadrangolari; le porzioni mature della pianta sono coperte da una corteccia biancastra piuttosto ruvida e ricca di scanalature; le radici sono lunghe e cilindriche e coperte da una corteccia rossastra. Le foglie sono variabili, di 3-9 cm di lunghezza e 1-4 cm di larghezza, disposte in gruppi da tre a otto (solitamente quattro). Il frutto appare globoso, nero-violaceo e contiene due piccoli semi. I fiori sono piccoli, bianchi e verdastri.

Manjishta si trova nelle zone collinari, fino a 3750 metri di altitudine, in Africa tropicale, nel nord del Sud-Est asiatico e ad est, in Tibet ed in Cina.

Nella Medicina ayurvedica *Manjishta* è nota per la sua azione detossificante a livello epatico e renale e trova largo impiego nel trattamento di un’ampia gamma di condizioni morbose, dai tumori alle infezioni croniche. L’uso di *Manjishta* è tradizionalmente indicato nella cura delle malattie ematiche e questo si può dedurre dal suo pigmento rosso intenso, che ricorda il colore del sangue. Così *Manjishta* può essere utilizzata ogni qualvolta vi sia infiammazione o sanguinamento, ad esempio nel trattamento di condizioni infiammatorie della pelle come acne o per contrastare il sanguinamento associato a disfunzione uterina. *Manjishta* è altrettanto indicata nei casi di ematuria, in associazione con erbe come *Gokshura* e *Agnimantha*.

Assunta assieme ad erbe come *Madhuka* (*Glycyrrhiza glabra*), *Guduchi*, *Katuki* e *Chandana Manjishta* può essere efficace nella cura dell’ulcera peptica.

Nel trattamento dell'artrite reumatoide, del lupus eritematoso e della gotta, *Manjishta* è spesso applicata localmente come olio medicinale, più comunemente sotto forma di preparazione chiamata 'Pinda taila', composta da *Manjishta*, *Sarjasa* (resina di *Vateria indica*), *Sariva* (*Hemidesmus indicus*), cera d'api ed olio di sesamo, allestiti sottoforma di decotto acquoso.

Manjishta può essere utilizzato anche nella cura di disturbi oculari, quali congiuntivite e glaucoma.

Costituenti chimici

I dati bibliografici dimostrano che le principali sostanze coloranti della radice di *Rubia cordifolia* sono due antrachinoni: la purpurina e la xantopurpurina.

Oltre a questi coloranti, è stata riportata la presenza di alizarina e xantina (6). Le radici contengono resine dal colore rosso (1,2%), materie estrattive (39%), una sostanza marrone rossastra solubile in alcool (1,9%), sostanze gommose (9%), della fibra legnosa (22,5%), materiale solubile in cloruro di potassio (4,6%), sali di ossido di calcio, coloranti (1,8%) ed acqua (12%). (132,133,134).

Quattro esapeptidi biciclici, noti come RA-XI, XII, XIII e XIV sono stati isolati da *Rubia cordifolia* ed uno studio condotto *in vitro* sulla linea cellulare leucemica murina P 388 ha dimostrato il loro potenziale antitumorale (135). Successivamente, sono stati isolati quattro esteri dell'acido naftoico, compreso il nuovo composto rubilactone (33) e due nuovi esapeptidi biciclici dall'azione antitumorale, noti come RA-XV e XVI (73).

Inoltre, gli estratti etanolic della radice di *Rubia cordifolia* sono stati analizzati mediante spettrometria, la quale ha rivelato la presenza di sette antrachinoni noti come 2-metil-9,10-antrachinone; 3,6-triidrossi-9,10-antrachinone; 1 idrossi-9,10-antrachinone; 1,2,4-triidrossi-9,10-antrachinone; 2-metil-1,3,6-triidrossi-9,10-antrachinone-3-O-beta-D-glucoside; 1,2-dihidroxy-9,10-antrachinone-2-O-beta-D-xylosyl-beta-D-glucoside; 2-metil-1,3,6-trihydroxy-9,10-antrachinone-3-O-beta-D-xylosyl-beta-D-(6-O acetil)glucoside (136).

L'anidride naftoidrochinone e due derivati dell'acido benzoico sono stati isolati dall'estratto in cloroformio della radice di *Rubia cordifolia* (137).

Inoltre, dalle radici e dallo stelo di *Rubia cordifolia* sono stati isolati tre nuovi derivati antraceni, denominati Rubiasin A, B e C (138).

Nella radice della pianta sono stati rintracciati anche componenti quali: mollugin (19,6%), furomollugin (17,4%), eugenolo (12,7%) ed anetolo (10,6%) (139). Epoxymollugin, è stato

isolato dall'estratto in cloruro di metilene proveniente dalla radice di *Rubia cordifolia* ed ha dimostrato di possedere proprietà antitumorali (140).

Proprietà farmacologiche

Effetto antiossidante

L'estratto alcolico di *Rubia cordifolia* ed il suo principale costituente, la rubiadina (1,3-diidrossi-2-metil antrachinone), inibiscono la perossidazione lipidica indotta dal FeSO₄ nel fegato di ratto in maniera dose dipendente. L'estratto grezzo mostrava proprietà sia ossidanti sia riducenti ed inibiva l'ossidazione del glutatione ridotto, mentre rubiadin mostrava un effetto esclusivamente ossidante, convertendo il Fe²⁺ a Fe³⁺ (141). L'inibizione della perossidazione lipidica risultava maggiore rispetto a quella esercitata dall'EDTA, Tris, mannitolo, vitamina E e p-benzochinone (142). Un estratto non alcolico di *Rubia cordifolia* è stato studiato nel fegato di ratto, ed è stato osservato che impedisce la formazione, indotta dall'idroperossido di cumene, del principale prodotto della perossidazione degli acidi grassi polinsaturi, la malondialdeide (143).

Effetto antidiabetico

L'estratto in etilacetato della radice di *Rubia cordifolia* ha mostrato attività anti-diabetica (144). Anche l'estratto etanolic delle parti aeree della pianta ha dimostrato di possedere un'attività ipoglicemizzante nei ratti (145).

Effetto anticonvulsivante

È stato studiato l'effetto farmacologico di un triterpene isolato dalla frazione solubile in acetone di un estratto in etere di petrolio di *Rubia cordifolia* sulle convulsioni indotte sperimentalmente in ratti e topi, come pure sul comportamento e sui livelli di acido gamma-amminobutirrico (GABA) e serotonina (5-HT) contenuti a livello cerebrale. È stato osservato che il triterpene isolato inibiva le convulsioni indotte da elettroshock, Pentilentetrazolo (PTZ), e litio-pilocarpina. Esso, inoltre, si è rivelato capace di potenziare l'effetto di sonnolenza indotto dal fenobarbiturico e di aumentare i livelli cerebrali di GABA e 5-HT (146).

Effetto antispasmodico

Un estratto grezzo di *Rubia cordifolia* è stato saggiato in preparati tissutali per la sua possibile attività antagonizzante il canale del calcio. Dallo studio è emerso che l'estratto sembrava capace di sopprimere le contrazioni del digiuno nel coniglio e dell'utero nel ratto in maniera dose-dipendente. I tessuti pretrattati con l'estratto vegetale o con il verapamil, usato

come controllo positivo di efficacia, inibivano le contrazioni spontanee degli animali, indicando che l'estratto ha un'attività antispasmodica simile a quella del verapamil e suggerendo la presenza di fitocostituenti simili ai bloccanti del canale del calcio (147).

Effetto antitrombotico

L'effetto di una frazione parzialmente purificata di *Rubia cordifolia* è stato studiato su piastrine di coniglio; da tale studio è emerso che l'estratto in esame era in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta dal fattore attivante le piastrine (PAF). La frazione ha anche inibito il legame di 3H-PAF alle piastrine, in modo dose-dipendente (148).

MATERIALE E METODO

ALLESTIMENTO DEI DECOTTI VEGETALI E LORO CARATTERIZZAZIONE

Preparazione dei decotti vegetali

Il decotto di ciascuna pianta in esame è stato preparato secondo il metodo descritto nella farmacopea ayurvedica indiana (Ayurvedic Pharmacopoeia Committee, 1989).

10 g di radici o frutti polverizzati sono stati posti in una beuta contenente 300 ml di acqua. La beuta è stata sottoposta a riscaldamento con lo scopo di portare ad ebollizione moderata il contenuto fino alla riduzione del volume a circa 1/4 rispetto a quello di partenza. Successivamente, il decotto risultante è stato filtrato, congelato a -20°C, liofilizzato per circa 48 ore, aliquotato e conservato a temperatura ambiente (RT).

Caratterizzazione dei decotti vegetali

Determinazione della quantità totale di flavonoidi

Il contenuto in flavonoidi è stato determinato tramite un metodo della farmacopea (Farmacopea, Stato dell'URSS, 1989) che utilizza la rutina come composto di riferimento.

50 µl di decotto acquoso (1 mg/ml) sono stati miscelati con 500 µl di alluminio tricloruro in metanolo (2% w/v) e portati a volume finale di 1 ml con metanolo. L'assorbimento a 430 nm è stato letto tramite uno spettrofotometro (JascoV-530, Tokyo) dopo incubazione (15 minuti) a temperatura ambiente (RT). Per l'allestimento della curva di calibrazione con la rutina, aliquote in DMSO di 50 µl alla concentrazione di 100, 50, 20 e 10 µg/ml sono state miscelate con gli stessi reagenti come sopra descritto.

Determinazione della quantità totale di polifenoli

La quantità di polifenoli presente nei decotti vegetali è stata determinata mediante il metodo Folin-Ciocalteu (149). 50 µl di decotto vegetale liofilizzato in acqua (1mg/ml) sono stati miscelati con 250 µl del reagente Folin-Ciocalteu (diluito 1:10) ed acqua sino ad ottenere un volume finale di 800 µl. La miscela è stata incubata a RT per alcuni minuti e successivamente addizionata di 800 µl carbonato di sodio (Na₂CO₃ al 20%). L'assorbimento a 760 nm è stato letto dopo due ore mediante uno spettrofotometro (JascoV-530, Tokyo).

Per l'allestimento della curva di calibrazione con l'acido gallico, aliquote in etanolo di 50 µl alle concentrazioni di 200, 100, 50, 20 e 10 µg/ml sono state miscelate con gli stessi reagenti come sopra descritto.

VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ: TEST DEL NEUTRAL RED

La citotossicità dei decotti vegetali è stata valutata sulle RAW 264.7 (Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line) tramite il test del rosso neutro (Neutral red). Il saggio del rosso neutro è un test colorimetrico basato sulla capacità delle cellule vitali di incorporare il rosso neutro all'interno dei lisosomi.

Gli xenobiotici sono in grado di indurre alterazioni della membrana cellulare che conducono alla fragilità lisosomiale, con l'inevitabile conseguenza di un ridotto assorbimento del rosso neutro. Pertanto, il numero di cellule vitali e la quantità di colorante incorporato nelle cellule risultano direttamente correlati.

Le concentrazioni di farmaco da sottoporre al saggio sono state scelte in modo del tutto arbitrario partendo da una concentrazione molto elevata e pertanto certamente citotossica, pari a 10 mg/ml. A partire da questa dose di decotto vegetale sono state effettuate diluizioni scalari (1:10) fino alla concentrazione più bassa, pari a 0.001 mg/ml.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTI-OSTEOCLASTICA

L'attività anti-osteoclastica dei decotti vegetali in esame è stata valutata sia in termini di un effetto sull'osteoclastogenesi, ossia la formazione di nuovi osteoclasti, che di un effetto nell'indurre apoptosi degli osteoclasti maturi.

Isolamento di osteoclasti umani da sangue periferico

Gli osteoclasti sono stati ottenuti mediante il differenziamento di cellule mononucleate isolate da sangue periferico umano (PBMC). Dopo aver diluito i buffy coats in PBS (1:1), le PMBC sono state separate mediante centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll-Hystopaque, Sigma), e lavate con PBS. Si è poi proceduto alla semina cellulare alla densità di 3×10^6 cellule/cm² in D-MEM ad alto contenuto di glucosio (Euroclone) al 10% FBS (Pierce). Dopo 1 ora, le cellule non aderenti sono state rimosse e al terreno di coltura fresco sono stati aggiunti due fattori differenzianti: RANKL (30 ng/ml, Peprotech) e M-CSF (25 ng/ml, Peprotech).

Incubazione degli osteoclasti con i decotti

I decotti vegetali sono stati addizionati al terreno di coltura alle dosi opportunamente selezionate sulla base del precedente screening di citotossicità, in tempi diversi a seconda dei due obiettivi sperimentali:

a) Valutazione dell'effetto sull'osteoclastogenesi

Già a partire dal primo giorno di coltura, le cellule sono state trattate per 7 giorni con le dosi selezionate di ciascun decotto vegetale. Come controllo negativo è stato utilizzato il solo terreno addizionato dei fattori differenzianti; come controllo positivo di efficacia dell'attività di inibizione della formazione di nuovi osteoclasti è stato impiegato l'alendronato sodico (Sigma) alla concentrazione 100 μ M. Al termine del trattamento farmacologico, e quindi a distanza di 7 giorni dalla semina (periodo necessario per la formazione degli osteoclasti), le cellule sono state caratterizzate per la formazione di elementi multinucleati e per l'espressione citochimica del tipico marker osteoclastico, la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRACP). Le metodiche di caratterizzazione impiegate a tale scopo sono descritte di seguito nel paragrafo 'Caratterizzazione degli osteoclasti'. Lo schema sperimentale è illustrato in Figura 8a.

b) Valutazione dell'effetto di induzione apoptotica degli osteoclasti maturi

Le dosi selezionate di ciascun decotto vegetale sono state aggiunte alle colture di osteoclasti a distanza di 7 giorni dalla semina, ovvero su osteoclasti già differenziati. Come controllo negativo è stato utilizzato il solo terreno addizionato dei fattori differenzianti. Come controllo positivo dell'efficacia dell'attività biologica è stato impiegato l'alendronato sodico alla concentrazione 100 μ M. La valutazione dell'apoptosi osteoclastica è stata effettuata al 14° giorno di coltura (dopo 7 giorni di trattamento farmacologico), tramite la caratterizzazione delle cellule per la formazione dell'anello di actina tipico dell'osteoclasto e per la presenza di nuclei picnotici, come descritto nel paragrafo subito di seguito. Lo schema sperimentale è illustrato in Figura 8b.

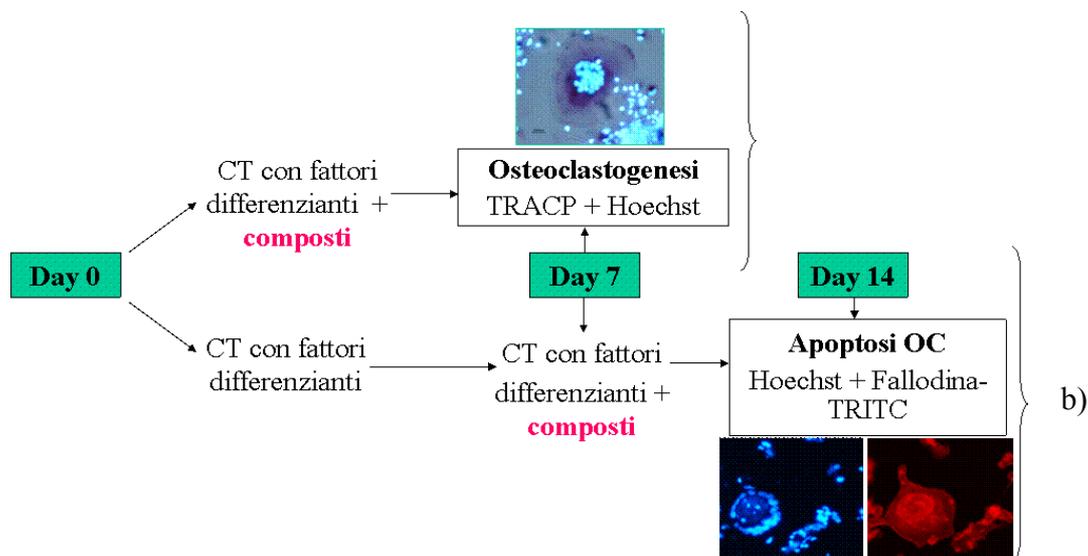


Figura 8. Schema sperimentale per la valutazione dell'effetto anti-osteoclastico dei decotti vegetali. Valutazione dell'effetto sull'osteoclastogenesi e relativa immagine di un osteoclasto maturo caratterizzato tramite doppia marcatura con Hoechst 33258 e TRACP (a). Valutazione dell'effetto sull'apoptosi osteoclastica e relative immagini di un osteoclasto apoptotico caratterizzato tramite doppia marcatura con Hoechst 33258 e Falloidina-TRITC (b). CT = cambio di terreno.

Caratterizzazione degli osteoclasti

a) Valutazione dell'effetto sull'osteoclastogenesi

L'osteoclastogenesi è stata valutata tramite la caratterizzazione delle cellule per la formazione di elementi multinucleati e per l'espressione citochimica della TRACP.

Al termine del periodo di coltura si è proceduto alla fissazione delle cellule con paraformaldeide al 3% addizionata del 2% di saccarosio in PBS per 20 minuti a RT e alla permeabilizzazione con Hapes-Triton allo 0,5% per 5 minuti a RT. Successivamente, l'attività della TRACP è stata valutata per mezzo dell'incubazione con il colorante citochimico (Acid Phosphatase kit, Sigma) per 60 minuti a 37°C. Al termine dell'incubazione, i nuclei sono stati colorati con Hoechst 33258 (2,25 µg/ml, Sigma) per 10 minuti a RT al buio. Le cellule rosse TRACP-positive sono state osservate al microscopio ottico ed i nuclei evidenziati in microscopia a fluorescenza. Le cellule TRACP-positive con 3 o più nuclei sono state considerate osteoclasti e quantificate tramite conta al microscopio a fluorescenza. L'attività dei decotti vegetali oggetto della sperimentazione è stata espressa come percentuale di osteoclasti maturi presenti, ovvero come percentuale di osteoclastogenesi, rispetto alla coltura di controllo.

b) Valutazione dell'effetto di induzione apoptotica degli osteoclasti maturi

L'apoptosi osteoclastica è stata valutata tramite caratterizzazione degli osteoclasti per la formazione dell'anello di actina e per la presenza di nuclei picnotici.

A tale scopo, le cellule sono state fissate e permeabilizzate come descritto nel precedente paragrafo, ed incubate con Falloidina-TRITC 0.1 mg/mL (Sigma) per 45 minuti a RT al buio. Tale incubazione è stata immediatamente seguita dall'incubazione con il colorante nucleare Hoechst 33258 (2,25 µg/ml, Sigma) per 10 minuti a RT al buio. Le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza: l'anello di actina, marcato con Falloidina-TRITC, è apparso di colore rosso, mentre i nuclei/corpi apoptotici, marcati con Hoechst 33258, sono apparsi blu. Le cellule multinucleate in cui risultava evidente la presenza dell'anello di actina (osteoclasti totali) e gli osteoclasti in cui risultavano evidenti i corpi apoptotici (osteoclasti apoptotici) sono stati quantificati tramite conta al microscopio a fluorescenza. L'attività dei decotti vegetali oggetto della sperimentazione è stata espressa come percentuale di apoptosi (numero di osteoclasti apoptotici / numero osteoclasti totali X 100) e confrontata con il risultato ottenuto nelle colture di controllo.

VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ SU PRECURSORI OSTEOGENICI

Colture cellulari di MSC

Le MSC isolate da campioni di midollo osseo per mezzo della centrifugazione per gradiente di densità (Ficoll-Hystopaque, Sigma) sono state seminate alla concentrazione di 1×10^4 cellule e mantenute in atmosfera umidificata a 37°C a livelli di CO₂ pari al 5% in alpha modification of Eagle's medium (α -MEM; Sigma-Aldrich) addizionato di FBS al 10%, penicillina 100 U/mL, streptomicina 0.1mg/ml, 10^{-8} M desametasone, acido ascorbico 2-fosfato 100mM (Sigma-Aldrich).

Le cellule sono state trattate per 7 giorni con le dosi dei decotti vegetali risultate non citotossiche nella linea cellulare RAW 264.7 ed efficaci nei precedenti test di valutazione dell'attività anti-osteoclastica. Come controllo negativo è stato utilizzato il solo terreno addizionato dei fattori differenzianti.

Vitalità cellulare

Dopo i 7 giorni di trattamento con i decotti vegetali, è stata valutata la vitalità cellulare tramite il saggio Alamar Blue (Serotec, Oxford, UK), secondo le istruzioni fornite dal

produttore. L'Alamar Blue è un indicatore redox fluorimetrico/colorimetrico che viene internalizzato dalle cellule e convertito dalla forma ossidata non fluorescente/blu a quella ridotta fluorescente/rossa. L'indicatore non ha alcun effetto tossico sulle cellule, e la sua riduzione, indice dell'attività metabolica, si correla con il numero di cellule vitali. Il mezzo di coltura delle cellule è stato rimosso dai pozzetti e sostituito, in condizioni di sterilità, con terreno fresco contenente un volume di Alamar Blue pari al 10%. Un pozzetto privo di cellule, contenente terreno di coltura e Alamar Blue al 10%, è stato utilizzato come "bianco" per la correzione dei valori di fluorescenza rilevati nei campioni. Le piastre sono state incubate a 37°C, a livelli di CO₂ pari al 5% per 3 ore e 30 minuti. Al termine dell'incubazione il surnatante è stato trasferito in una nuova piastra e la fluorescenza rilevata con un lettore per micropiastre (Cytofluor™ 2350, Millipore, Bedford, MA) utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 540 nm e di emissione pari a 590 nm. I risultati del saggio sono stati espressi come media delle unità di fluorescenza relativa (RFU) rilevate in 4 pozzetti.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando Statview 5.01 per Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC). I dati quantitativi sono stati espressi come media aritmetica più o meno l'errore standard della media (SEM). Abbiamo ipotizzato che l'attività biologica dei composti in esame potrebbe essere influenzata da molteplici variabili indipendenti, ovvero il tipo di composto e la sua concentrazione. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata applicata per rilevare gli effetti delle variabili indipendenti sui risultati quantitativi. Valori di P inferiori a 0.05 sono stati considerati come statisticamente significativi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

CARATTERIZZAZIONE DEI DECOTTI VEGETALI

Determinazione della quantità totale di flavonoidi

La quantità di flavonoidi presente nei decotti vegetali oggetto dello studio è stata espressa in termini di RE (equivalente di rutina - μg di rutina/mg di decotto) ed è riportata nella tabella seguente:

| Decotti vegetali | Contenuto in flavonoidi ($\mu\text{g}/\text{mg}$) |
|----------------------------|---|
| <i>Emblica officinalis</i> | 7.84 |
| <i>Hemidesmus indicus</i> | 28.75 |
| <i>Asparagus racemosus</i> | 1.87 |
| <i>Rubia cordifolia</i> | 30.25 |

Determinazione della quantità totale di polifenoli

La quantità di polifenoli presente nei decotti vegetali oggetto dello studio è stata espressa in termini di GAE (equivalenti acido gallico - μg acido gallico/mg di decotto) ed è riportata nella tabella seguente:

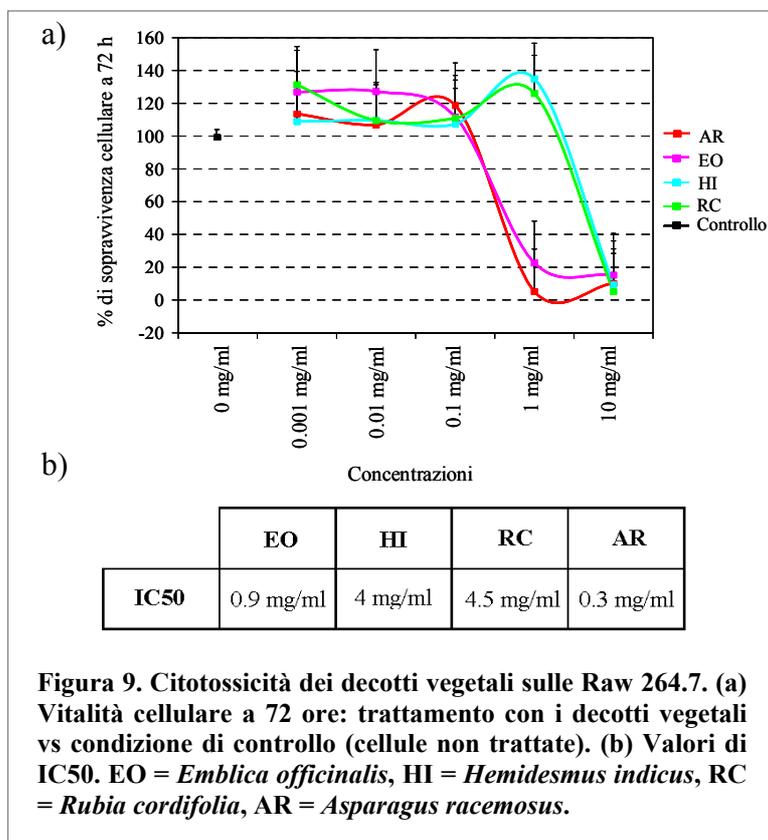
| Decotti vegetali | Contenuto in polifenoli ($\mu\text{g}/\text{mg}$) |
|----------------------------|---|
| <i>Emblica officinalis</i> | 173.84 |
| <i>Hemidesmus indicus</i> | 49.79 |
| <i>Asparagus racemosus</i> | 18.78 |
| <i>Rubia cordifolia</i> | 29.41 |

SCREENING DI CITOTOSSICITÀ

Lo screening della citotossicità dei decotti vegetali è stato condotto su preosteoclasti murini (RAW 264.7) allo scopo di selezionare le dosi opportune di composto da saggiare sugli osteoclasti nelle analisi successive.

Il grafico in Figura 9 mostra la ratio tra la densità ottica (OD) misurata nelle RAW 264.7 trattate con i decotti vegetali e quella misurata nelle stesse cellule coltivate in condizioni standard, dopo 72 ore di coltura. Il decotto di *Asparagus racemosus* ed *Emblica officinalis* è risultato citotossico già alla dose di 1 mg/ml. Al contrario, alla stessa dose le cellule trattate con il decotto di *Hemidesmus indicus* e *Rubia cordifolia* hanno mostrato un indice di sopravvivenza cellulare che non si discostava in modo significativo da quello riscontrato nella coltura di controllo. Infatti, il decotto di tali piante è risultato citotossico unicamente alla concentrazione 10 mg/ml.

I risultati del test di citotossicità sono stati utilizzati per il calcolo dei valori di IC50, mostrati nella tabella in Figura 9. A partire da tali valori, per ciascun decotto vegetale sono state selezionate 4 dosi potenzialmente non citotossiche da saggiare su osteoclasti umani allo scopo di indagarne il potenziale anti-osteoclastico.



VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTI-OSTEOCLASTICA

Ai fini della valutazione dell'attività anti-osteoclastica delle piante in esame, è stato indotto il differenziamento di cellule mononucleate isolate da sangue periferico umano (PBMC) tramite trattamento con agenti differenzianti; parallelamente e in tempi diversi a seconda del tipo di saggio, i precursori osteoclastici sono stati trattati con i decotti vegetali alle dosi selezionate in seguito al pre-screening di citotossicità: 0.5-0.25-0.1-0.05 mg/ml per *Asparagus racemosus* ed *Emblica officinalis* e 2-1-0.5-0.25 mg/ml per *Hemidesmus indicus* e *Rubia cordifolia*. Come controllo positivo di efficacia farmacologica è stato utilizzato l'alendronato in quanto la sua attività anti-osteoclastica *in vitro* è stata ampiamente descritta e discussa in uno studio condotto in precedenza nel nostro laboratorio (150).

Pertanto, è stato valutato il potenziale anti-osteoclastico dei decotti vegetali, inteso sia come effetto sulla formazione di nuovi osteoclasti (osteoclastogenesi) che come effetto nell'indurre apoptosi degli osteoclasti maturi.

Valutazione dell'effetto sull'osteoclastogenesi

Il grafico in Figura 10 rappresenta la percentuale di osteoclastogenesi riscontrata nelle colture cellulari trattate con il terreno differenziante addizionato dei decotti alle varie concentrazioni rispetto a quella riscontrata nella coltura di controllo, trattata con il solo terreno differenziante. Tale percentuale è stata espressa come numero di osteoclasti contati nella coltura trattata/numero di osteoclasti contati nella coltura di controllo X 100.

Come ci si aspettava, il trattamento delle cellule con l'alendronato (controllo positivo di efficacia farmacologica) ha indotto un'inibizione della formazione di nuovi osteoclasti pari a circa il 100% (97 ± 2 %); in altri termini, la coltura trattata con il bisfosfonato risultava quasi totalmente priva di osteoclasti, nonostante il terreno di coltura contenesse fattori differenzianti.

Alle maggiori concentrazioni saggiate, tutti i decotti sono stati in grado di interferire con l'osteoclastogenesi, inibendola fortemente ed in modo del tutto sovrapponibile all'attività di inibizione dell'alendronato.

Asparagus racemosus, *Emblica officinalis* e *Rubia cordifolia* hanno inibito l'osteoclastogenesi in modo dose-dipendente, mentre *Hemidesmus indicus* ha mostrato un effetto sovrapponibile a quello esercitato dall'alendronato e, sorprendentemente, a tutte le concentrazioni, incluse le più basse.

La percentuale di osteoclastogenesi è risultata ridotta anche con dosi più blande di ciascuno dei decotti in esame, facendo eccezione per *Emblica officinalis* la quale, alle concentrazioni 0.1 e 0.05 mg/ml, non ha esercitato alcun effetto.

Le più alte concentrazioni di *Rubia cordifolia* e *Hemidesmus indicus* impiegate nella inibizione dell'osteoclastogenesi non erano risultate tossiche nel test di vitalità sulle RAW 264.7, essendo inferiori alla IC50. Tuttavia, occorre tenere conto del fatto che lo screening di citotossicità è stato effettuato in un arco temporale di 72 ore, mentre la valutazione dell'osteoclastogenesi richiede un tempo di coltura più lungo e, di conseguenza, un trattamento con i decotti prolungato. Inoltre, le dosi selezionate sono comprese in un log10 di dosi con un range estremamente ampio (>1 mg/ml e < 10 mg/ml). Pertanto, non si può escludere che l'effetto anti-osteoclastico osservato a 1 mg/ml e 2 mg/ml sia determinato dalla tossicità dei decotti, mentre l'attività biologica osservata a 0.5 mg/ml e 0.25 mg/ml sembra esserne indipendente.

Le più alte concentrazioni di *Asparagus racemosus* ed *Emblica officinalis* sono anch'esse comprese in un log10 di dosi, con un range più ristretto (> 0.1 mg/ml e < 1mg/ml). Anche in questo caso non si può escludere che l'effetto anti-osteoclastico osservato a 0.5 mg/ml e 0.25 mg/ml sia determinato dalla tossicità dei decotti, mentre l'attività biologica osservata alle concentrazioni più basse di *Asparagus racemosus* (< 0.25 mg/ml) sembra esserne indipendente.

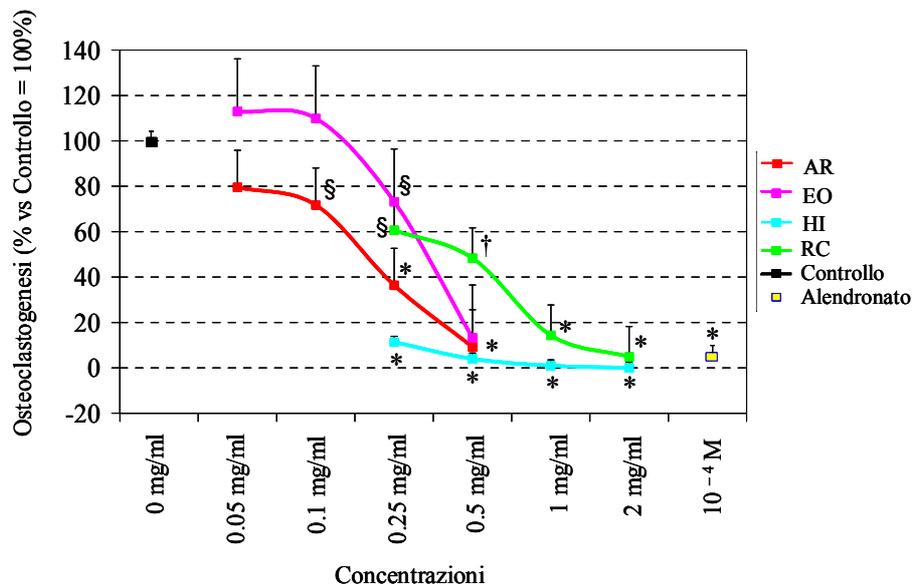


Figura 10. Osteoclastogenesi (% rispetto al controllo trattato con soli agenti differenzianti = 100%) confrontata con quella riscontrata nella coltura trattata con l'alendronato (controllo positivo). N° totale osteoclasti contati in 36 campi in duplicato x 2 esperimenti indipendenti. § = P < 0.05 vs Controllo; † = P < 0.01 vs Controllo * = P < 0.001 vs Controllo. EO = *Emblica officinalis*, HI = *Hemidesmus indicus*, RC = *Rubia cordifolia*, AR = *Asparagus racemosus*.

Valutazione dell'effetto di induzione apoptotica degli osteoclasti maturi

Come mostrato in Figura 11, la percentuale di osteoclasti apoptotici non è risultata particolarmente elevata nelle colture di controllo ($30 \pm 2 \%$), ma è aumentata significativamente in seguito al trattamento con la maggiore concentrazione di tutti i decotti vegetali, facendo eccezione per *Asparagus racemosus*. In particolare, a questa concentrazione *Emblica officinalis* e *Hemidesmus indicus* hanno esercitato un effetto pro-apoptotico sovrapponibile a quello dell'alendronato (controllo positivo). L'effetto pro-apoptotico di queste piante si è evidenziato anche con le dosi più basse del decotto. Inoltre, *Hemidesmus* ha mostrato un effetto dose-dipendente. *Rubia cordifolia* alla concentrazione 2 mg/ml, pur non avendo un effetto paragonabile a quello dell'alendronato, ha indotto un'apoptosi maggiore del 20% rispetto a quella osservata nelle colture di controllo ($P = 0.002$).

Come sopra accennato, l'unica pianta a non aver avuto effetto nell'indurre apoptosi osteoclastica è stata *Asparagus racemosus* che alle maggiori concentrazioni sembra addirittura esercitare un effetto protettivo nei confronti degli osteoclasti, preservandone l'apoptosi.

Emblica ed *Hemidesmus* sono risultate le piante più efficaci nell'indurre apoptosi osteoclastica. Anche per l'effetto pro-apoptotico valgono le considerazioni fatte per l'inibizione dell'osteoclastogenesi, ovvero non si può escludere che l'attività di *Hemidesmus indicus*, osservata a 1 mg/ml e 2 mg/ml, e quella di *Emblica officinalis* a 0.5 mg/ml e 0.25 mg/ml dipenda dalla tossicità dei decotti, mentre alle concentrazioni più basse è probabilmente attribuibile ad un effetto farmacologico. Per quanto riguarda l'effetto pro-apoptotico, i due decotti sembrano avere la stessa efficacia e potenza, sebbene siano stati saggiati a concentrazioni diverse sulla base dei risultati ottenuti nel test di citotossicità sulle RAW 264.7. I risultati ottenuti con i decotti di *Emblica officinalis* sono in accordo con quanto riportato da Penolazzi et al. (109). Questi autori hanno dimostrato che basse concentrazioni di *Emblica officinalis* sono in grado di indurre apoptosi di osteoclasti maturi, senza alterare il processo di osteoclastogenesi.

Contrariamente a quanto rilevato nella inibizione dell'osteoclastogenesi, il decotto di *Rubia cordifolia* non è risultato particolarmente efficace nell'indurre apoptosi. Tuttavia, come detto in precedenza, l'effetto osservato con la più alta dose di *Rubia cordifolia* potrebbe essere attribuito alla tossicità del decotto.

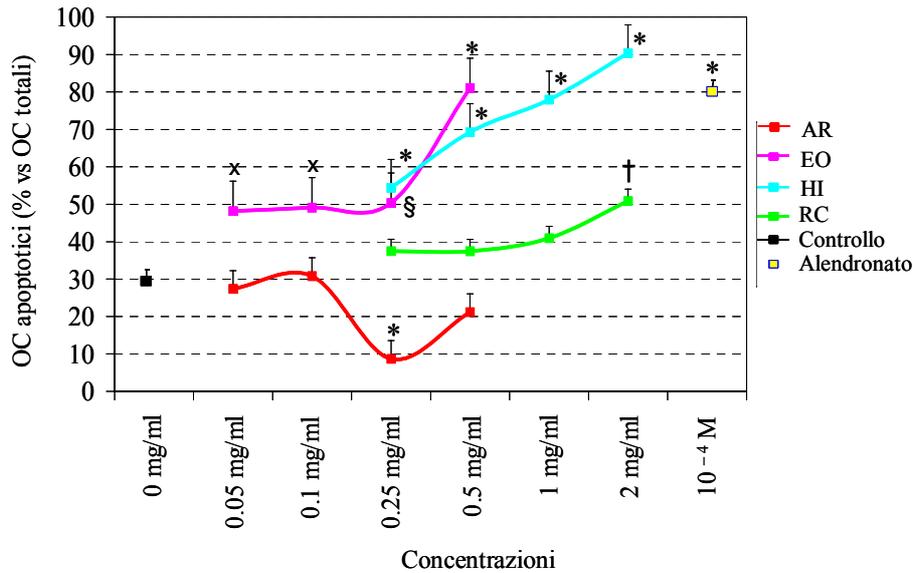


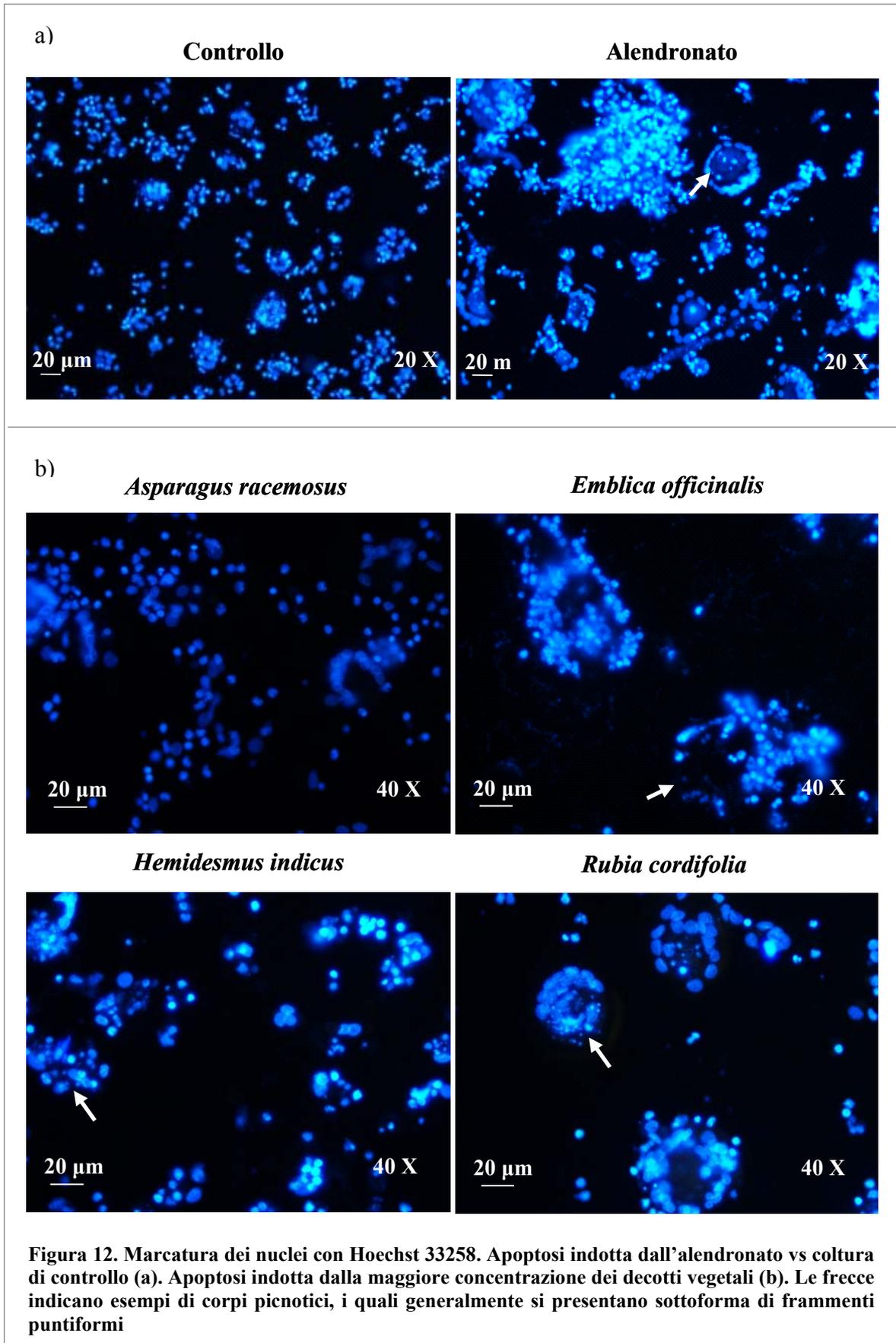
Figura 11. Apoptosi osteoclastica (% OC apoptotici rispetto al N° di OC totali contati in 36 campi in triplicato x 2 esperimenti indipendenti) confrontata con quella riscontrata nella coltura trattata con l'alendronato (controllo positivo). † = P < 0.05 vs Controllo; § = P < 0.01 vs Controllo; * = P < 0.001 vs Controllo. OC = osteoclasti. EO = *Emblica officinalis*, HI = *Hemidesmus indicus*, RC = *Rubia cordifolia*, AR = *Asparagus racemosus*.

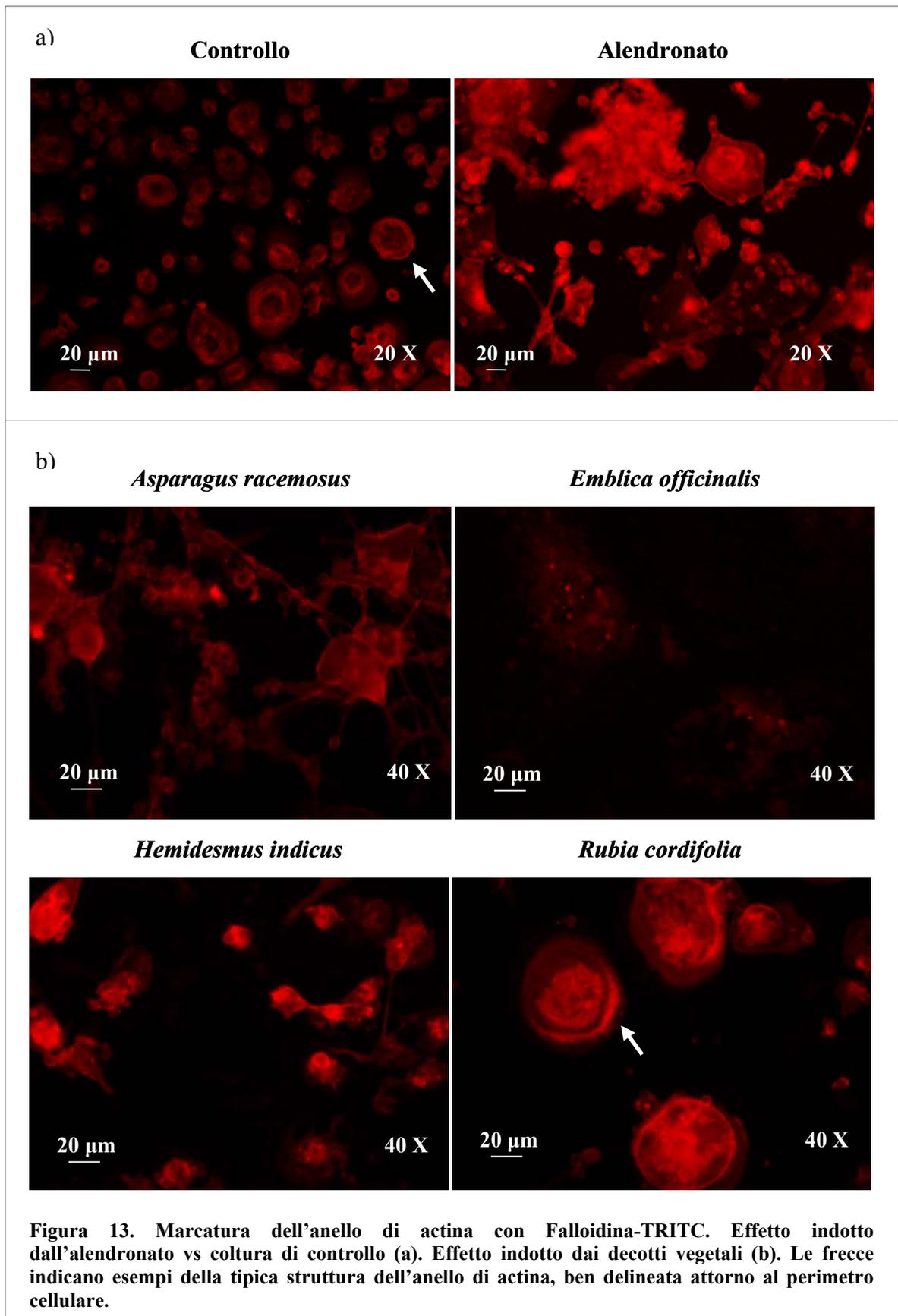
Per chiarire meglio l'effetto indotto sugli osteoclasti dal trattamento con la maggiore concentrazione dei decotti vegetali, sono riportate qui di seguito le immagini relative alla doppia marcatura degli osteoclasti con Hoechst 33258 (Figura 12) e Falloidina-TRITC (Figura 13), finalizzata ad evidenziare lo stato nucleare della cellula e la struttura dell'anello di actina dell'osteoclasto. La presenza di corpi picnotici nucleari è indice di apoptosi cellulare, mentre l'anello di actina è una struttura tipica dell'osteoclasto implicata nel processo di adesione cellulare alla matrice ossea. Nelle colture di controllo la presenza di osteoclasti con nuclei picnotici è quasi nulla (Figura 12, a) e le cellule presentano la classica struttura circolare dell'anello di actina (Figura 13, a). In seguito a trattamento con alendronato (controllo positivo), gli osteoclasti appaiono ricchi di nuclei picnotici (Figura 12, a) e soggetti ad una profonda destrutturazione dell'anello di actina (Figura 13, a).

Alla maggiore concentrazione (0.5 mg/ml) *Emblica officinalis* genera picnosi nucleare (Figura 12, b) e perdita dell'anello di actina (Figura 13, b); nelle colture di osteoclasti trattate con *Hemidesmus indicus* alla concentrazione 2 mg/ml le cellule appaiono piccole, con una completa destrutturazione dell'anello di actina (Figura 13, b) e con numerosi nuclei picnotici (Figura 12, b). Diversamente, gli osteoclasti osservati nella coltura cellulare trattata con la maggiore dose di *Rubia cordifolia* (2 mg/ml) presentano nuclei picnotici (Figura 12, b) ma

con un anello di actina ben definito (Figura 13, b), risultando più simili a quelli della coltura di controllo trattati con solo terreno differenziante (Figura 13, a).

Come già descritto, *Asparagus racemosus* si è dimostrata l'unica pianta ad esercitare un effetto nullo sull'apoptosi osteoclastica. Tuttavia, all'osservazione al microscopio a fluorescenza, gli osteoclasti trattati con la dose più alta di *Asparagus* (0.5 mg/ml) non presentano molti nuclei picnotici ma risultano fortemente destrutturati nell'anello di actina (Figura 13, b) se messi a confronto con quelli della coltura di controllo (Figura 13, a). Questo risultato depone a favore dell'effetto anti-osteoclastico di *Asparagus*, ma probabilmente questo si esplica attraverso un meccanismo diverso da quello delle altre piante.





VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ SU PRECURSORI OSTEOGENICI

Come detto in precedenza, tutti i decotti si sono dimostrati efficaci nell'inibire l'osteoclastogenesi o nell'indurre l'apoptosi, ma alcuni di questi solo alle più alte concentrazioni. Le dosi selezionate per la valutazione dell'attività anti-osteoclastica erano inferiori alla IC50 calcolata sulla base del test di vitalità sulle RAW 264.7, ma le condizioni di coltura erano differenti. Lo screening di citotossicità è stato effettuato in un arco temporale di 72 ore, mentre la valutazione dell'attività anti-osteoclastica necessita di un trattamento prolungato con i decotti, in quanto l'osteoclastogenesi e l'induzione di apoptosi richiedono tempi di coltura più lunghi. Pertanto, non si può escludere che l'attività anti-osteoclastica sia stata determinata dalla tossicità delle molecole naturali.

Questi risultati ci hanno fatto ipotizzare che le molecole naturali, pur essendo efficaci nell'inibire il riassorbimento osseo, potessero essere dannose per le cellule responsabili del processo di osteoformazione. Poiché queste piante sono state studiate al fine di valutare il loro potenziale terapeutico nel trattamento delle malattie da aumentato riassorbimento osseo, gli eventuali effetti tossici sugli osteoblasti e sulla loro funzione di deporre nuova matrice ossea devono essere esclusi.

A tale scopo, i decotti sono stati saggiati su precursori degli osteoblasti alla concentrazione di 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml e 0.1 mg/ml, ed il trattamento è stato protratto per sette giorni così come era stato effettuato per i test dell'attività anti-osteoclastica.

Le dosi sono state selezionate scegliendo come criterio l'efficacia dimostrata nella inibizione dell'osteoclastogenesi, ma escludendo le concentrazioni 1 mg/ml e 2 mg/ml in quanto considerate tossiche anche in base ai risultati di altri studi condotti su modelli sperimentali in vitro (77, 120, 151, 152).

I risultati ottenuti sono riportati in Figura 14 e di seguito commentati:

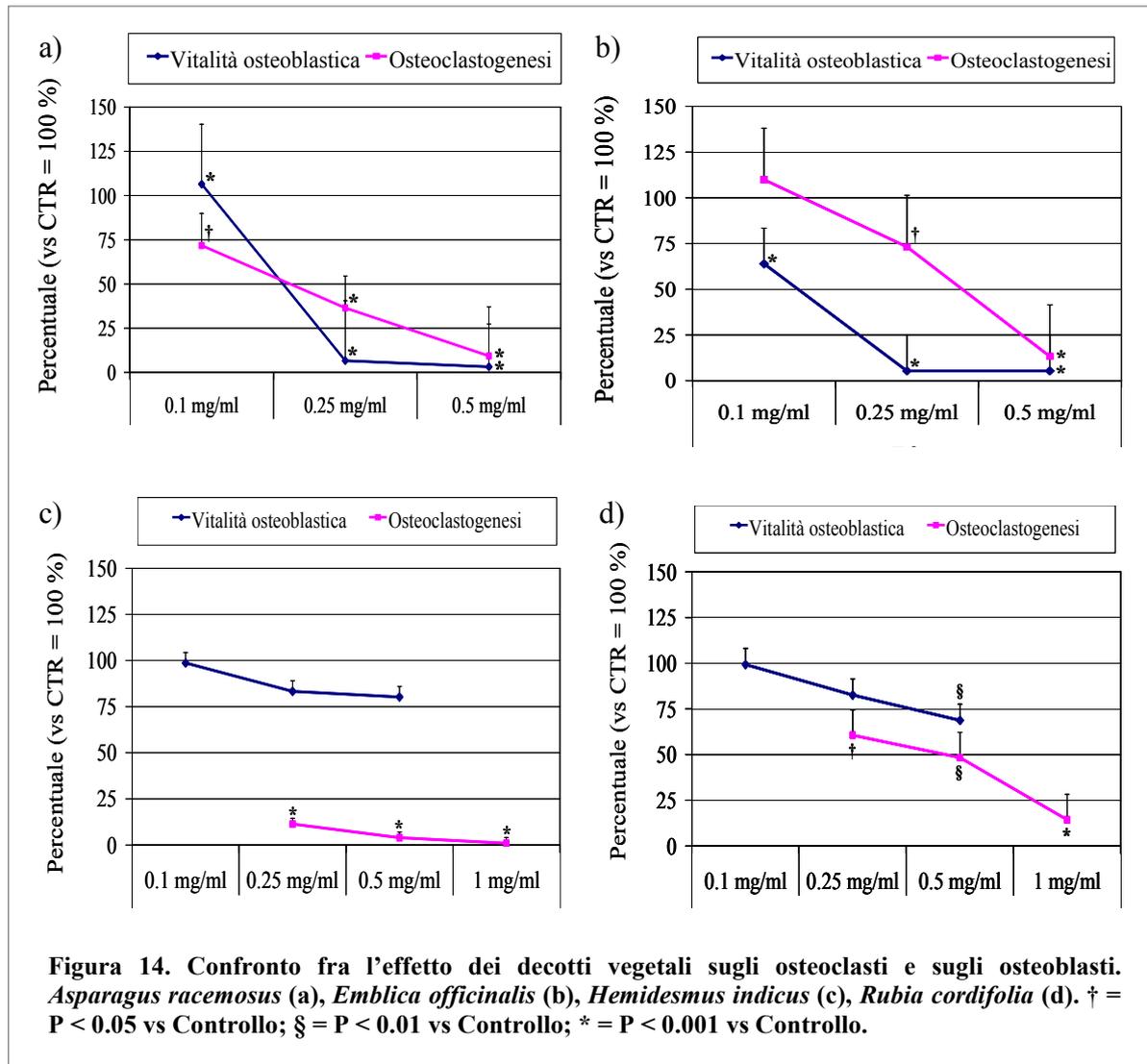
Asparagus Racemosus. Alle concentrazioni 0.5 mg/ml e 0.25 mg/ml, il decotto ha inibito completamente la proliferazione degli osteoblasti, mentre a 0.1 mg/ml non si è dimostrato tossico. Il risultato dimostra che l'effetto anti-osteoclastico osservato alle concentrazioni più elevate è determinato dalla tossicità dei decotti, mentre l'attività biologica osservata alla dose inferiore sembra esserne indipendente. Tuttavia, *Asparagus racemosus* non è in grado di indurre l'apoptosi degli osteoclasti maturi a nessuna delle concentrazioni usate. La totale mancanza di questa attività biologica, che ha un ruolo determinante nell'inibizione farmacologica del riassorbimento osseo, rende questa pianta meno interessante per quanto riguarda la possibile applicazione nelle malattie da aumentato riassorbimento osseo.

Emblica Officinalis. Il decotto si è dimostrato tossico a tutte le concentrazioni impiegate, anche alla dose non efficace nella inibizione dell'osteoclastogenesi. Altri autori hanno dimostrato (109) che basse concentrazioni di *Emblica officinalis* non alterano il processo di osteoclastogenesi ma sono in grado di indurre apoptosi di osteoclasti maturi interferendo con NF-κB, un fattore di trascrizione coinvolto nella biologia osteoclasti. Tuttavia, la soppressione dell'attività di NF-κB ha un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare. Infatti, è stato riportato l'effetto antiproliferativo esercitato da *Emblica officinalis* su cellule tumorali (78). Dai nostri risultati emerge che l'effetto tossico si esplica anche su cellule normali in attiva proliferazione, come nel caso dei precursori osteogenici, dimostrando che questa pianta non è idonea per essere utilizzata nel trattamento delle malattie da aumentato riassorbimento osseo, vista la elevata tossicità nei confronti delle cellule deputate alla formazione di nuovo tessuto osseo.

Hemidesmus Indicus. Le concentrazioni 0.5 mg/ml e 0.25 mg/ml, efficaci nell'inibire l'osteoclastogenesi e nell'indurre l'apoptosi di osteoclasti neoformati, non hanno inibito la proliferazione dei precursori osteogenici normali. Al contrario, altri autori hanno dimostrato una spiccata attività anti-proliferativa di *Hemidesmus indicus*, su cellule tumorali umane anche a basse concentrazioni (121). Una possibile spiegazione di tale discrepanza potrebbe risiedere nel meccanismo di azione con cui *Hemidesmus indicus* esplica la propria attività farmacologica, e che potrebbe essere diverso per cellule tumorali e cellule normali. Fimognari et al hanno dimostrato che *Hemidesmus indicus* è in grado di indurre l'apoptosi in cellule di leucemia mielomonocitica o monocitica interferendo con meccanismi cellulari legati all'attività mitocondriale.(153) Poiché gli osteoclasti derivano da precursori emopoietici della linea monocitaria è ipotizzabile che le alterazioni osservate da Fimognari et al siano alla base degli effetti anti-osteoclastici che abbiamo osservato nel nostro studio. Gli osteoclasti sono cellule che presentano caratteristiche contrastanti, ovvero hanno una scarsa capacità di sopravvivenza, ma svolgono attività ad elevato consumo energetico, come il riassorbimento osseo.(154). È ipotizzabile, quindi, che cellule con tali caratteristiche siano particolarmente sensibili a sostanze che interferiscono con le funzioni mitocondriali. Per alcuni aspetti, i risultati ottenuti con *Hemidesmus indicus* richiamano il meccanismo di azione dei bisfosfonati, i quali sono in grado di alterare l'attività dei mitocondri (155), sono scarsamente tossici e possono avere un effetto anti-apoptotico su osteoblasti ed osteociti.(156)

L'efficacia anti-osteoclastica e l'assenza di tossicità nei confronti dei precursori osteogenici rendono questa pianta un possibile candidato da utilizzare nel trattamento delle malattie da aumentato riassorbimento osseo.

Rubia Cordifolia. *Rubia cordifolia* aveva dimostrato una attività anti-osteoclastica a 0.5 mg/ml e 0.25 mg/ml. Alla concentrazione più alta il decotto ha inibito la proliferazione delle MSC, mentre a 0.25 mg/ml gli effetti tossici non erano più rilevabili, dimostrando che l'attività biologica osservata a questa concentrazione sembra essere indipendente da un meccanismo citotossico. Tuttavia, la scarsa attività pro-apoptotica di questa pianta potrebbe limitarne l'efficacia terapeutica nel trattamento nelle malattie da aumentato riassorbimento.



CONCLUSIONI

La tabella seguente riporta una sintesi dei risultati ottenuti con l'obiettivo di confrontare l'attività biologica delle piante oggetto dello studio. A tale scopo, per ogni saggio effettuato, è stato attribuito uno score arbitrario impiegando la seguente scala:

P non significativo = 0

$P < 0.05 = 1$

$P < 0.01 = 2$

$P < 0.001 = 3$

La tabella riporta il valore ottenuto per ogni parametro misurato ad ogni concentrazione di decotto, essendo C1 la concentrazione più elevata. Gli score relativi all'attività anti-osteoclastica sono stati considerati come valori positivi, in quanto indicatori di efficacia, mentre quelli relativi alla inibizione della proliferazione dei precursori osteogenici sono stati considerati come negativi, in quanto indicatori di effetti indesiderati. Lo score totale corrisponde alla somma algebrica degli score ottenuti da ogni pianta.

| | Inibizione osteoclastogenesi | | | | Induzione apoptosi degli osteoclasti | | | | Inibizione della proliferazione degli osteoblasti | | | Score Totale |
|----|------------------------------|----|----|----|--------------------------------------|----|----|----|---|----|----|--------------|
| | C1 | C2 | C3 | C4 | C1 | C2 | C3 | C4 | C1 | C2 | C3 | |
| AR | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -3 | -3 | 0 | 1 |
| EO | 3 | 1 | 0 | 0 | 3 | 1 | 2 | 2 | -3 | -3 | -3 | 3 |
| HI | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 24 |
| RC | 3 | 3 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | -2 | 0 | 0 | 9 |

Tabella degli score. AR = *Asparagus racemosus*, EO = *Emblca officinalis*, HI = *Hemidesmus indicus*, RC = *Rubia cordifolia*.

Fra tutte le piante valutate in questo studio, *Hemidesmus Indicus* presenta le caratteristiche più idonee per essere considerata un possibile candidato da utilizzare nel trattamento delle malattie da aumentato riassorbimento osseo. Infatti, ha dimostrato la maggiore efficacia anti-osteoclastica, sia in termini di inibizione dell'osteoclastogenesi che di induzione apoptotica, e non ha interferito con la capacità proliferativa dei precursori osteogenici.

Anche *Rubia Cordifolia* ha dimostrato una certa efficacia nell'inibire l'osteoclastogenesi, ma il suo score è risultato molto inferiore rispetto a quello osservato per *Hemidesmus Indicus*, a causa della scarsa attività pro-apoptotica e dell'effetto negativo sulla proliferazione dei pre-

osteoblasti alla più alta concentrazione. Queste caratteristiche potrebbero limitare l'efficacia terapeutica della *Rubia* nel trattamento delle malattie da aumentato riassorbimento.

Asparagus Racemosus non è in grado di indurre l'apoptosi degli osteoclasti maturi a nessuna delle concentrazioni usate. La totale mancanza di questa attività biologica, che ha un ruolo determinante nell'inibizione del riassorbimento osseo, rende questa pianta meno interessante per quanto riguarda la possibile applicazione terapeutica.

Il decotto di *Emblica Officinalis* si è dimostrato tossico nei confronti delle cellule deputate alla formazione di nuovo tessuto osseo a tutte le concentrazioni impiegate, anche alla dose non efficace nella inibizione dell'osteoclastogenesi. Per tale motivo, questa pianta non ci sembra idonea per essere utilizzata nel trattamento delle malattie da aumentato riassorbimento osseo.

In conclusione, lo screening di efficacia ci ha permesso di selezionare una pianta con proprietà potenzialmente sfruttabili nel trattamento delle malattie da aumentato riassorbimento osseo. Ulteriori studi ci permetteranno di approfondire meglio le proprietà farmacologiche di *Hemidesmus indicus*. Sebbene nella medicina tradizionale la pianta venga frequentemente impiegata come decotto, dal punto di vista scientifico sarà importante evidenziare i fitocostituenti responsabili dell'attività anti-osteoclastica, allo scopo di comprenderne meglio i meccanismi d'azione e per poter sviluppare nuovi approcci terapeutici, adiuvanti o preventivi, basati sull'uso di queste sostanze.

2. MOLECOLE BIOATTIVE SINTETICHE PER LA TERAPIA DI MALATTIE DA AUMENTATO RIASSORBIMENTO OSSEO

INTRODUZIONE

BISFOSFONATI

I bisfosfonati, scoperti alla fine degli anni '60, sono una classe di farmaci largamente impiegata per inibire il riassorbimento osseo in malattie osteolitiche caratterizzate da un aumento del numero o dell'attività degli osteoclasti, come l'osteoporosi, la malattia di Paget e l'osteolisi secondaria a neoplasie (157).

Struttura chimica

Dal punto di vista chimico, i bisfosfonati sono analoghi sintetici del pirofosfato inorganico, una molecola molto abbondante nel siero e nelle urine, capace di prevenire la calcificazione dei tessuti molli legandosi ai cristalli di idrossiapatite ossea di nuova formazione (158). Esso conserva le sue proprietà farmacologiche solo se somministrato per via parenterale, mentre se somministrato oralmente viene degradato dalle pirofosfatasi contenute nell'orletto a spazzola delle cellule epiteliali di rivestimento del tratto gastrointestinale. I bisfosfonati differiscono dai pirofosfati per la presenza di un atomo di carbonio in sostituzione dell'atomo di ossigeno legato ai due residui fosfato. L'atomo di carbonio rende la struttura molecolare chimicamente stabile ed in grado di resistere all'attività enzimatica delle pirofosfatasi, al calore, agli acidi e a molti altri enzimi idrolitici, pur conservando le proprietà chimico-fisiche proprie del pirofosfato (Figura 1). Il termine "bisfosfonati geminali", o più semplicemente "bisfosfonati", deriva appunto dalla presenza di due legami carbonio-fosforo sullo stesso atomo di carbonio.

Il gruppo P-C-P è responsabile dell'elevata affinità di legame dei bisfosfonati nei confronti di ioni metallici bivalenti come il Ca^{2+} ed è portatore di due catene laterali, R^1 ed R^2 , che influenzano l'affinità, la potenza relativa ed il profilo di tossicità dei composti (Figura 1).

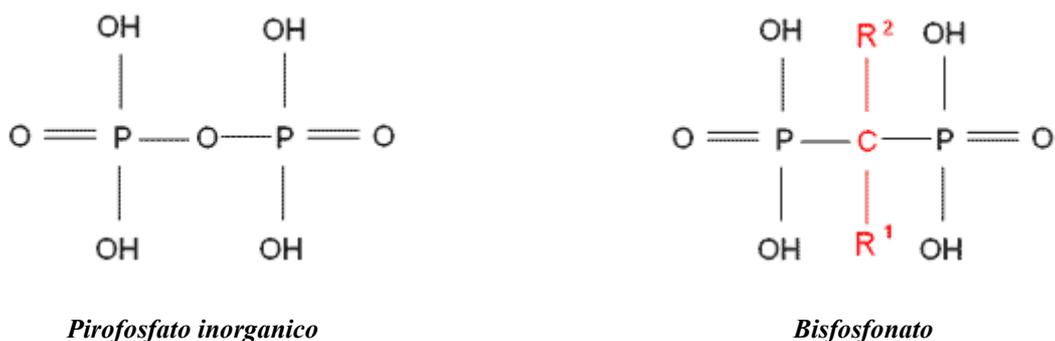


Fig. 1: Formule chimiche del pirofosfato e dei bisfosfonati a confronto.

La catena R^1 , normalmente più corta, partecipa al legame con la matrice ossea mineralizzata e la presenza, in questa posizione, di un gruppo ossidrilico OH aumenta ulteriormente l'affinità per il calcio mediante l'instaurazione di un legame trivalente. Le differenze nell'affinità di legame all'osso possono influenzare molte importanti proprietà biologiche dei bisfosfonati, come l'uptake e la ritenzione nello scheletro, la diffusione ed il rilascio del farmaco che trasportano, e gli effetti sulle funzioni cellulari all'interno del microambiente osseo (159). La catena R^2 è invece responsabile delle proprietà biologiche del bisfosfonato, prima fra tutte l'attività antiriassorbitiva, e differisce notevolmente da composto a composto. L'esterificazione del fosfato e la varietà nella tipologia di catene laterali che si possono legare all'atomo di carbonio, sono alla base della diversificazione nella struttura chimica dei bisfosfonati sino ad oggi sintetizzati, ciascuno dei quali presenta caratteristiche fisico-chimiche e biologiche diverse, con un particolare profilo di attività (Figura 2). Per esempio, aggiungendo un gruppo ossidrilico sull'atomo di carbonio in posizione R^1 , l'azione inibente il riassorbimento osseo è in parte aumentata, come si verifica per quanto riguarda l'etidronato (Figura 2, g); allungando la catena alifatica in R^2 , la potenza farmacologica aumenta per ogni atomo di carbonio aggiunto, fino ai 9 atomi di carbonio, ma un ulteriore allungamento determina una riduzione dell'attività. Dalla fine degli anni '80 sono stati sintetizzati composti con attività antiriassorbitiva sempre maggiore, ottenuti mediante la sostituzione della sola catena laterale R^2 e mantenendo invariata la catena laterale R^1 , che ne determina il grado di affinità con i cristalli di idrossiapatite. Inoltre, la presenza di un atomo di azoto primario a livello della catena R^2 rende l'azione antiosteolitica da 10 a 100 volte più potente (160). L'introduzione nella struttura dei bisfosfonati di gruppi amminici ha condotto alla formazione di amino-derivati come il pamidronato (Figura 2, a), lo zoledronato (Figura 2, c), l'ibandronato (Figura 2, d), il risedronato (Figura 2, e) e l'alendronato (Figura 2, f); gli amino-bisfosfonati sono da ascrivere ad una classe indipendente di bisfosfonati sia per ciò che

riguarda la loro efficacia che per ciò che concerne il loro meccanismo d'azione molecolare: infatti, per questa classe di bisfosfonati l'attività anti-riassorbitiva non è correlata all'inibizione della mineralizzazione. I bisfosfonati che contengono un gruppo azotato terziario, come l'ibandronato (Figura 2, d) risultano ancora più attivi. I bisfosfonati con maggiore capacità anti-riassorbitiva sono quelli, come risedronato e zoledronato, che contengono un gruppo amminico all'interno di un anello eterociclico, infatti possiedono una attività 10.000 volte più potente rispetto a quella esercitata dall'etidronato in alcuni modelli sperimentali. Riassumendo, in base alla catena laterale R², è possibile classificare i bisfosfonati dal più potente al più debole, secondo l'attività antiosteolitica: zoledronato > alendronato > ibandronato = risedronato > etidronato.

Inoltre, diversi studi condotti *in vitro*, *in vivo* ed in clinica hanno dimostrato che i gli amino-bisfosfonati di ultima generazione, in particolare l'acido zoledronico, posseggono anche un'attività anti-tumorale in quanto sono in grado di ridurre le dimensioni delle metastasi attraverso l'inibizione dell'adesione, della proliferazione, dell'invasione delle cellule tumorali (161, 162), e dell'angiogenesi (163).

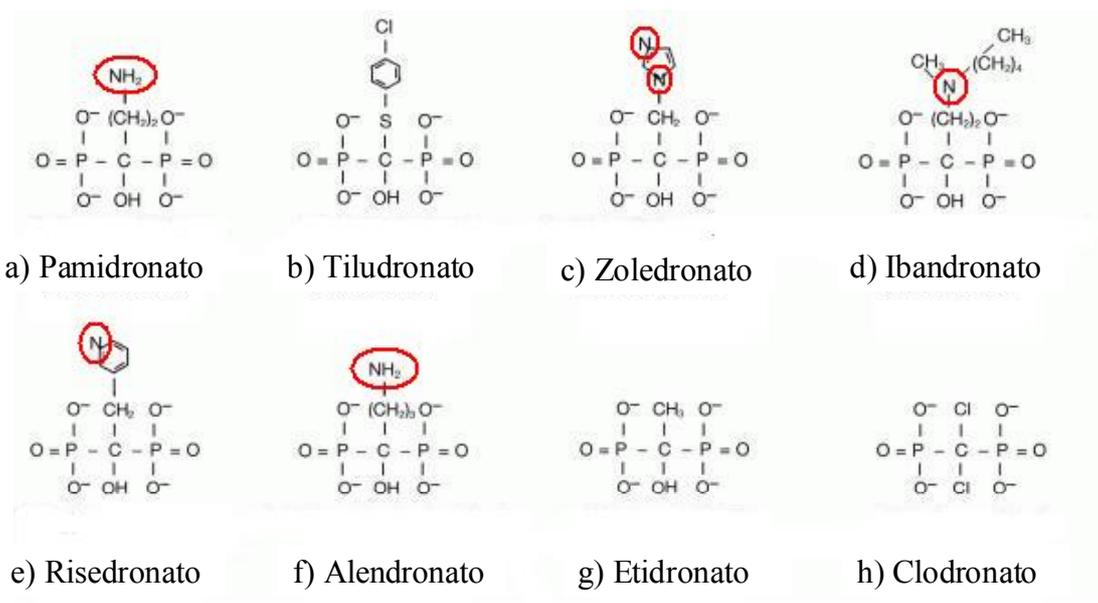


Figura 2. Struttura chimica di alcuni fra i principali bisfosfonati.

Azione dei bisfosfonati sul riassorbimento osseo

Mentre gli effetti esercitati dai bisfosfonati sulla calcificazione possono essere spiegati attraverso un meccanismo chimico-fisico di dissoluzione dei cristalli di idrossiapatite, lo

stesso meccanismo non è in grado di giustificare l'effetto di tali farmaci sul riassorbimento osseo. L'inibizione del riassorbimento osseo si esplica, infatti, attraverso un meccanismo biologico che si verifica su tre livelli principali: tissutale, cellulare e molecolare. Esso può essere diretto sugli osteoclasti o mediato da altre cellule bersaglio come quelle della linea osteoblastica ed i macrofagi.

Meccanismo d'azione a livello tissutale

A livello tissutale, l'effetto biologico di qualsiasi tipo di bisfosfonato sembra essere lo stesso ovvero un calo del turnover osseo associato ad una riduzione sia del riassorbimento che della formazione di nuovo osso. È stato dimostrato che i bisfosfonati sono in grado di condurre ad un bilancio positivo di calcio e di massa ossea.

Meccanismo d'azione a livello cellulare

I bisfosfonati inibiscono il riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti esercitando un effetto sul differenziamento degli osteoclasti stessi (osteoclastogenesi), sul reclutamento degli osteoclasti maturi e sulla loro attività riassorbitiva. Inoltre, sono in grado di indurre apoptosi osteoclastica (Figura 3). Tutti e quattro questi effetti possono essere causati da un'azione diretta del farmaco sugli osteoclasti o sui loro precursori oppure indirettamente mediante un'azione sulle cellule in grado di modulare gli osteoclasti.

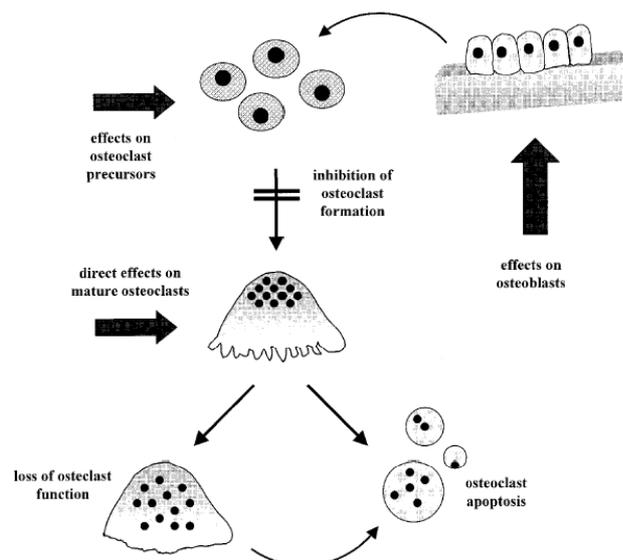


Figura 3. Vie attraverso le quali i bisfosfonati sono in grado di inibire l'attività di riassorbimento osseo osteoclasto-mediata. (Da Russel et al. 'Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates'. Cancer 2000;88:2961-78).

Inibizione del reclutamento e della formazione di nuovi osteoclasti (osteoclastogenesi)

L'ipotesi secondo la quale i bisfosfonati agirebbero inibendo il differenziamento dei precursori osteoclastici di origine midollare è sostenuta dall'osservazione che, dopo somministrazione endovenosa di bisfosfonati in casi di ipercalcemia maligna, il farmaco nella sua totalità raggiunge l'osso in 6 ore nonostante l'effetto farmacologico massimo sul tessuto osseo si manifesti solo a distanza di 2 giorni (164). Tale tipo di farmacocinetica si spiega con un'inibizione del reclutamento di nuovi osteoclasti, meccanismo che necessita di un periodo di tempo maggiore per determinare l'effetto biologico antiriassorbitivo.

Inoltre, studi *in vitro* condotti in colture a lungo termine di midollo osseo umano hanno dimostrato che i bisfosfonati sono in grado di inibire la formazione di cellule *osteoclast-like* (165). Anche in colture di organo, i bisfosfonati hanno dimostrato di inibire la formazione di osteoclasti maturi, probabilmente interferendo con il riconoscimento di fattori della matrice essenziali per la trasformazione, la maturazione e la fusione dei precursori osteoclastici (166, 167, 168).

I bisfosfonati sono anche potenti inibitori della proliferazione dei macrofagi, cellule appartenenti alla linea osteoclastica. In particolare, l'effetto dei bisfosfonati sembra essere specifico, o almeno più marcato, nei confronti della linea dei fagociti mononucleati (169).

Infine, in numerosi studi è riportato che l'inibizione del reclutamento di nuovi osteoclasti si osserva solo in presenza di osteoblasti (170, 171, 172), suggerendo l'ipotesi che l'effetto esercitato dai bisfosfonati sia in parte mediato da altre cellule bersaglio come, appunto, cellule della linea osteoblastica (173).

Effetti sulle altre cellule

È stato ampiamente dimostrato che cellule della linea osteoblastica sono responsabili del controllo del reclutamento e dell'attività degli osteoclasti, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Si ritiene che tale capacità regolatrice sia da attribuire alla loro capacità di secernere svariati fattori solubili (174, 175), alcuni dei quali capaci di stimolare sia l'osteoclastogenesi che l'attività osteoclastica (176, 177), come per esempio l'IL-6, citochina con attività osteoclastogenica e proinfiammatoria (178). *In vitro* i bisfosfonati impediscono la proliferazione degli osteoblasti (179) e, alcuni di essi, in particolare il pamidronato e lo zoledronato, sono in grado di inibire anche la proliferazione di altri tipi cellulari, come linfociti, macrofagi, cellule mielomatose e cellule derivanti da carcinoma polmonare. Nonostante vi sia una chiara evidenza *in vitro* degli effetti che i bisfosfonati esercitano sulla

cellula osteoblastica, la loro reale importanza *in vivo* è ancora incerta. Infatti, non è ben chiaro quale dei due meccanismi (quello diretto, sugli osteoclasti, e quello indiretto, sugli osteoblasti) sia presente *in vivo*, se presenti entrambi, quale dei due sia prevalente (180).

Inibizione dell'attività degli osteoclasti

L'elevata affinità dei bisfosfonati per la componente minerale porta ad una rapida rimozione di questi farmaci dal circolo ematico e alla loro localizzazione a livello dell'osso, dove si legano ai cristalli di idrossiapatite (181). Come descritto in precedenza, durante la fase di riassorbimento osseo, i cristalli di idrossiapatite si dissolvono in conseguenza dell'acidificazione della matrice ossea messa in atto dagli osteoclasti. Tale dissoluzione consente la liberazione dei bisfosfonati nello spazio extracellulare ed il loro contatto diretto con gli osteoclasti che provvedono ad internalizzarli per via endocitotica (182). Le altre superfici ossee non sono accessibili ai bisfosfonati in quanto rivestite da OB o da 'lining cells'.

Una volta internalizzati dagli osteoclasti, i bisfosfonati interferiscono con i pathways metabolici intracellulari richiesti per l'assolvimento delle normali funzioni della cellula, conducendo ad alterazioni nella morfologia dell'osteoclasti, osservabili sia *in vitro* (183,184) sia *in vivo* (185,186). Questi cambiamenti morfologici coinvolgono principalmente il citoscheletro; un particolare tratto distintivo degli osteoclasti trattati con i bisfosfonati è la perdita del caratteristico orletto a spazzola, espressione delle cellule in fase di attività, oltre ad alterazioni dell'actina e della vinculina. L'alterazione del citoscheletro osteoclastico può essere indirettamente causata anche dall'inibizione delle proteine chinasi e fosfatasi che regolano la struttura citoscheletrica. Ad esempio, è stato dimostrato che il tiludronato è in grado di aumentare i livelli di fosforilazione proteica negli osteoclasti inibendo l'attività delle fosfatasi (187). Si ipotizza, pertanto, che l'inibizione della defosforilazione proteica attuata dai bisfosfonati interferisca con la trasduzione del segnale negli osteoclasti, contribuendo in tal modo all'alterazione funzionale di queste cellule. Altri bisfosfonati, come il clodronato, l'etidronato, il pamidronato e l'alendronato, sono in grado di inibire l'acidificazione vacuolare negli osteoclasti intatti e la capacità di acidificare il mezzo circostante, condizione essenziale per la dissoluzione dei cristalli di idrossiapatite e quindi per la funzione di riassorbimento osseo (188, 189). È stato inoltre dimostrato un effetto diretto dei bisfosfonati nell'inibire l'attività di alcuni enzimi idrolitici quali le fosfatasi e nell'impedire il rilascio di enzimi lisosomiali in calvariae murine (190, 191). Tutti questi effetti, seppur indiretti, potrebbero contribuire all'azione complessiva dei bisfosfonati di inibizione del riassorbimento osseo.

Uno studio (192) ha dimostrato che le alterazioni morfologiche osservabili negli osteoclasti in seguito a trattamento con bisfosfonati si verificano solo quando le cellule sono in fase di attivo riassorbimento della matrice calcificata, oppure se il bisfosfonato viene iniettato all'interno delle cellule.

Induzione dell'apoptosi osteoclastica

L'apoptosi è una forma di morte cellulare che può essere distinta dalla necrosi sulla base delle caratteristiche alterazioni nella morfologia cellulare da essa indotte: condensazione cellulare e nucleare, condensazione cromatinica e frammentazione nucleare, così come la complessa sequenza di eventi biochimici inclusi il clivaggio internucleosomiale del DNA seguito dall'attivazione di un'endonucleasi.

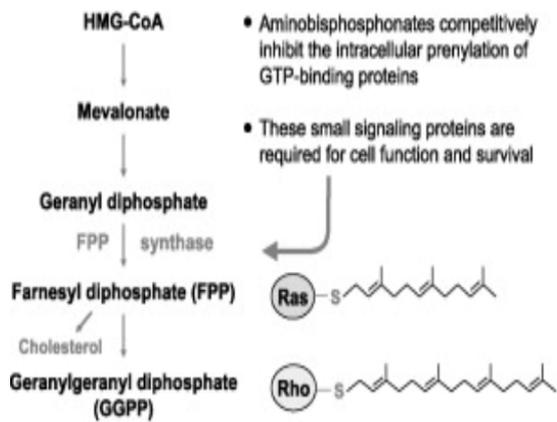
L'apoptosi indotta dai bisfosfonati non ha come bersaglio esclusivo gli osteoclasti: segni evidenti di apoptosi sono stati osservati in linee cellulari di mieloma umano (193) ed in cellule murine simil-macrofagiche (J774 e RAW 264) (194) dopo trattamento con aminobisfosfonati (pamidronato, alendronato e ibandronato); il clodronato si è dimostrato meno efficace nell'indurre apoptosi, mentre l'etidronato sembra non esercitare alcun effetto in tal senso. Tali osservazioni suggeriscono una diversità nel meccanismo d'azione tra amino e non amino-bisfosfonati.

Meccanismo d'azione molecolare

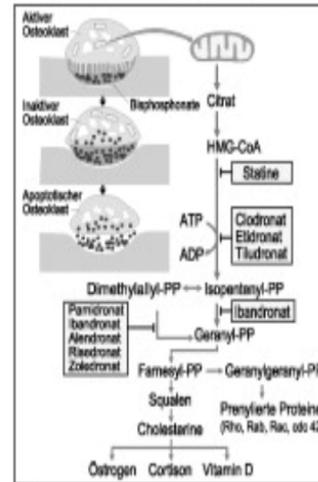
I bisfosfonati esercitano la loro attività antiosteolitica attraverso due meccanismi molecolari differenti. I non-amino bisfosfonati vengono incorporati come analoghi non idrolizzabili dell'adenosin trifosfato (ATP) (Figura 4, b). L'accumulo intracellulare di metaboliti non idrolizzabili come analoghi dell'ATP 27 ha degli effetti negativi sul metabolismo, sulla funzionalità e sulla sopravvivenza degli osteoclasti (160). Diversamente, gli amino-bisfosfonati come l'alendronato (ALE), che contengono un atomo di azoto basico primario nella catena alchilica, sono molto più potenti dei bisfosfonati che non contengono azoto. Essi esercitano la loro azione antiosteolitica attraverso l'inibizione del pathway del mevalonato, critico per la produzione del colesterolo, di altri steroli e dei lipidi isoprenoidi, come il farnesildifosfato (FPP) ed il geranilgeranildifosfato (GGPP). FPP e GGPP sono richiesti per la prenilazione post-traduzionale delle 'small GTPases' (195, 182194). Le 'small GTPases' (come Ras, Rho e Rac), regolano alcuni aspetti chiave della funzionalità degli

osteoclasti, come la morfologia, l'organizzazione del citoscheletro, la formazione dell'orletto a spazzola, il traffico vescicolare e la sopravvivenza (196, 197) (Figura 4, a).

(a) **Molecular Mechanism of Action of Nitrogen-containing Bisphosphonates**



(b) **Molecular Mechanism of Action of Non-amino Bisphosphonates (eg, Clodronate)**



Following uptake of clodronate, intracellular ATP is metabolized into a nonhydrolysable toxic ATP-analog (adenosine 5'-triphosphate)
Consequence: Loss of intracellular energy and apoptotic cell death

Figura 4. Meccanismo d'azione molecolare degli amino-bisfosfonati (a) e dei non-amino bisfosfonati (b). Modificata da Bartl R, Frisch B. 'Bisphosphonates for bones'. Blackwell Science, 2002.

MATERIALE E METODO

BISFOSFONATI IMPIEGATI

Le caratteristiche dei bisfosfonati (BP) valutati sono riportate nella tabella seguente:

| SERIE DI COMPOSTI SAGGIATI | COMPOSTO | CODICE | CARATTERISTICHE |
|---|-------------------------|-------------|--------------------------------|
| BP convenzionali (BPc) inclusi in ambedue le serie di composti saggiati | Alendronato | ALE | BP convenzionale |
| | Pamidronato | Pamidronato | |
| | Neridronato | Neridronato | |
| I | Chenodeossibisfosfonato | 1 | BP coniugato con acido biliare |
| | Ursodeossibisfosfonato | 2 | |
| | Colicobisfosfonato | 3 | |
| | Chenodeossicolato | 4 | Acido biliare |
| | Ursodeossicolato | 5 | |
| | Colato | 6 | |
| II | BP aromatico | 7 | BP contenente N |
| | BP alifatico | 8 | |
| | BP aromatico | 9 | |
| | BP alifatico | 10 | BP contenente S |
| | BP aromatico | 11 | |

Nella Figura 5 sono illustrate le strutture chimiche dei bisfosfonati convenzionali saggiati.

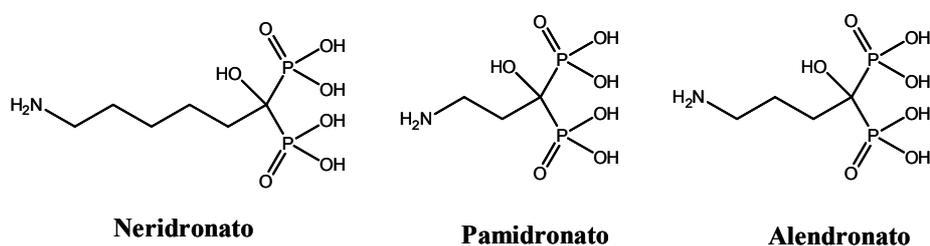
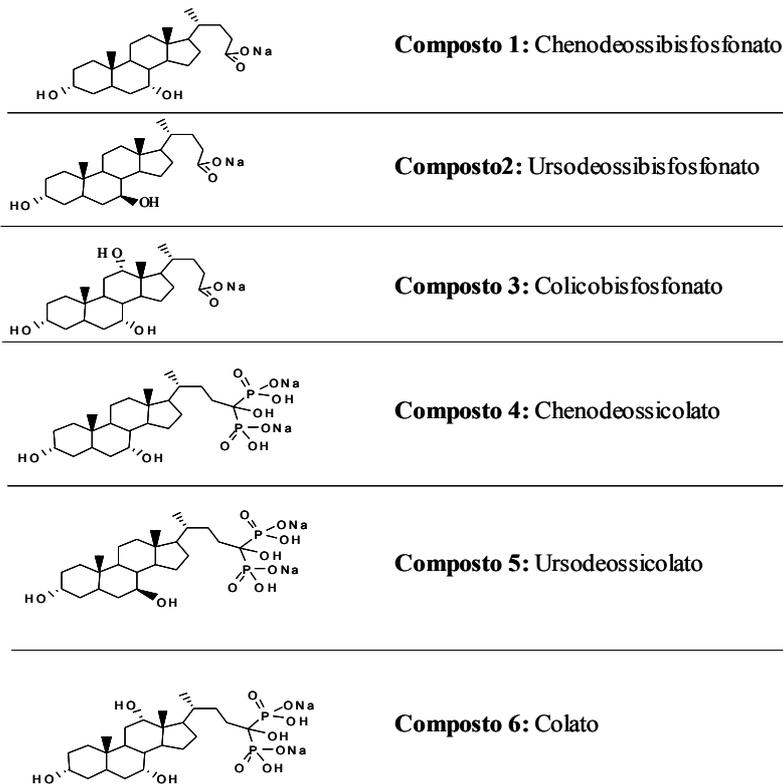


Figura 5. Bisfosfonati convenzionali (BPc) saggiati.

Nella Figura 6, invece, sono illustrati i bisfosfonati di nuova sintesi saggiati nella prima (a) e nella seconda serie di composti (b).

a)



b)

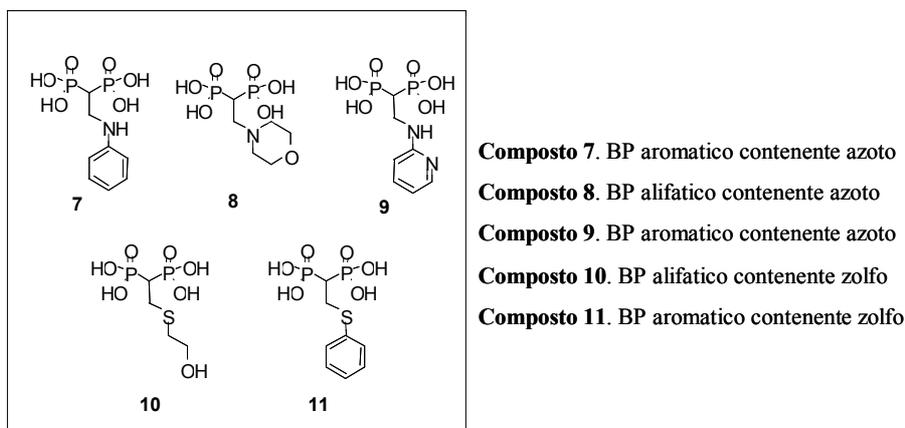


Figura 6. Prima (a) e seconda (b) serie dei bisfosfonati di nuova sintesi saggiati.

ANALISI DELLA CITOTOSSICITÀ: TEST DEL ROSSO NEUTRO

La citotossicità dei composti è stata valutata sulla linea fibroblastica murina L929 tramite il test del rosso neutro (198), come descritto nel capitolo precedente (pag. 58).

Le concentrazioni di farmaco da saggiare sono state selezionate sulla base della dose terapeutica di pamidronato utilizzata per la somministrazione sistemica, pari a 30 mg/ml (199). La somministrazione sistemica permette l'assorbimento completo del farmaco che è

diluito in 5 L di sangue (200). Tenendo conto che la ritenzione dei bisfosfonati a livello osseo può essere altamente variabile (201), il test di citotossicità è stato eseguito utilizzando una vasta gamma di concentrazioni di farmaci (da 10^{-9} M a 10^{-4} M).

ANALISI DELL'ATTIVITÀ ANTI-OSTEOCLASTICA

L'inibizione dell'attività osteoclastica è stata analizzata su colture primarie di osteoclasti umani generate isolando cellule mononucleate di sangue periferico umano (PBMC) da buffy coat come descritto nel capitolo precedente (pag. 58). I monociti così isolati sono stati in seguito seminati in terreno addizionato con fattori differenzianti e mantenuti in coltura per 7-14 giorni. L'inibizione dell'attività osteoclastica da parte dei bisfosfonati è stata valutata come capacità del farmaco di:

- a. inibire la formazione di nuovi osteoclasti (osteoclastogenesi);
- b. indurre l'apoptosi degli osteoclasti neoformati;
- c. interferire con la loro attività di degradazione del collagene umano di tipo I.

Valutazione dell'effetto sull'osteoclastogenesi

Le cellule sono state incubate con i composti già dal primo giorno di coltura e caratterizzate dopo 7 giorni per la formazione di cellule multinucleate e per l'espressione citochimica della fosfatasi acida tartrato-resistente (TRACP), come descritto nel capitolo precedente (pag. 60). Gli osteoclasti così caratterizzati sono stati quantificati mediante conta al microscopio a fluorescenza e tale quantificazione è stata espressa come percentuale di osteoclasti maturi presenti, ovvero come percentuale di osteoclastogenesi, rispetto alla coltura di controllo.

Valutazione dell'effetto di induzione apoptotica degli osteoclasti maturi

I composti sono stati addizionati agli osteoclasti già formati, ovvero a distanza di 7 giorni dalla semina. Le cellule sono state caratterizzate come descritto nel capitolo precedente (pag. 61). Le cellule multinucleate in cui risultava evidente la presenza dell'anello di actina (osteoclasti totali) e gli osteoclasti in cui risultavano evidenti i corpi apoptotici (osteoclasti apoptotici) sono stati quantificati tramite conta al microscopio a fluorescenza. L'attività biologica dei bisfosfonati è stata espressa come percentuale di apoptosi (numero di osteoclasti

apoptotici / numero osteoclasti totali X 100) e confrontata con il risultato ottenuto nelle colture di controllo.

Valutazione dell'inibizione della attività osteoclastica di degradazione del collagene di tipo I

Le PBMC sono state seminate in micropiastre ricoperte con collagene coniugato ad Europio (Osteolyse Assay Kit, Lonza). Dopo 7 giorni di coltura, si è proceduto all'incubazione delle cellule con le diluizioni scalari dei bisfosfonati in esame e con l'alendronato sodico. Dopo altri 7 giorni di coltura, il surnatante cellulare è stato trasferito in un'altra piastra contenente il Fluorophore Releasing Reagent. La presenza di Europio nel surnatante è stata quantificata con un fluorimetro a fluorescenza risolta nel tempo Wallac Victor (PerkinElmer, Monza, Italy) con un'eccitazione a 340 nm ed un'emissione a 615 nm ed è stata considerata indice dell'attività di degradazione del collagene da parte degli osteoclasti.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando Statview 5.01 per Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC). I dati quantitativi sono stati espressi come media aritmetica più o meno l'errore standard della media (SEM). Abbiamo ipotizzato che l'attività biologica dei composti in esame potrebbe essere influenzata da molteplici variabili indipendenti, ovvero il tipo di composto e la sua concentrazione. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata applicata per rilevare gli effetti delle variabili indipendenti sui risultati quantitativi. Il test post-hoc di Bonferroni-Dunn è stato applicato per evidenziare le differenze tra i gruppi. Valori di P inferiori a 0.05 sono stati considerati come statisticamente significativi.

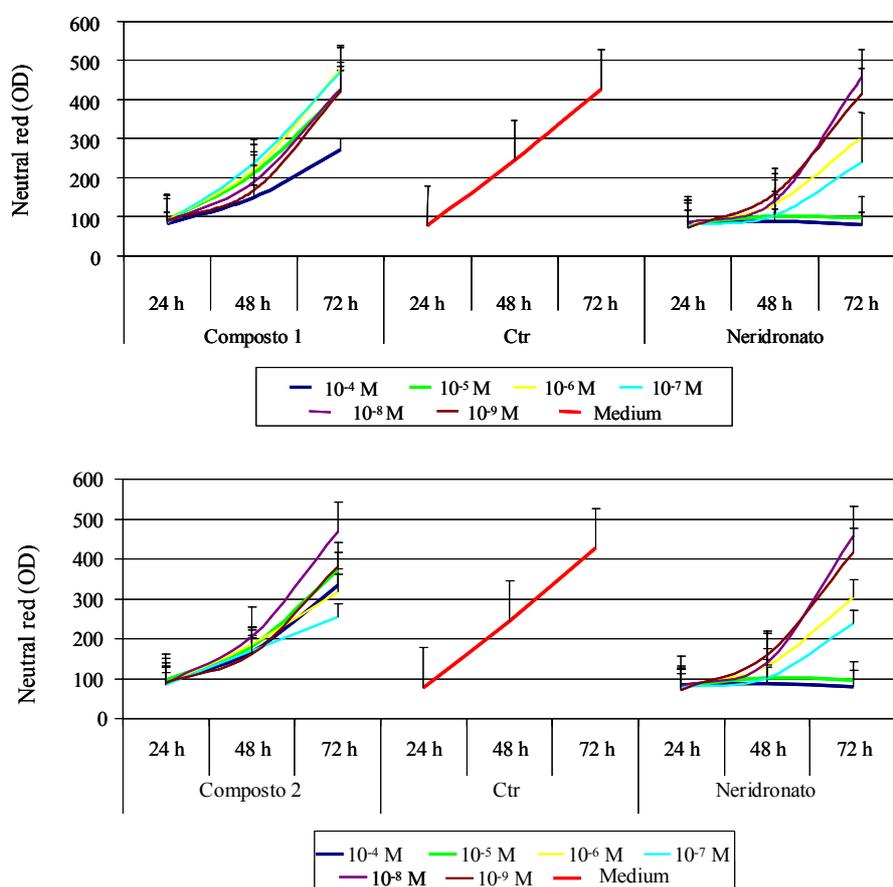
RISULTATI E DISCUSSIONE

Essendo la struttura chimica dei bisfosfonati saggiati molto varia (Figura 6, pag. 86), si è deciso di valutarne l'attività citotossica ed anti-osteoclastica suddividendoli in due gruppi sulla base delle analogie strutturali, e comparandone l'efficacia farmacologica con quella dei bisfosfonati convenzionali più simili ad essi dal punto di vista chimico. Per tale motivo, nei vari saggi sono stati selezionati come controllo positivo di efficacia talvolta il neridronato e talvolta il pamidronato. L'alendronato, invece, è stato incluso come controllo positivo in ambedue le serie di composti nei saggi dell'attività anti-osteoclastica di induzione apoptotica.

ANALISI DELLA CITOTOSSICITÀ

Prima serie di composti saggiati: composti 1-2-3 e loro rispettivi acidi biliari 4-5-6, confrontati con il neridronato.

Gli acidi biliari impiegati per la sintesi dei nuovi bisfosfonati non sono risultati citotossici ad alcuna delle concentrazioni saggiate (dati non mostrati). In generale, tutti i bisfosfonati coniugati con acidi biliari si sono rivelati meno citotossici rispetto al bisfosfonato convenzionale di riferimento (neridronato). Si è osservato un effetto di rallentamento della proliferazione cellulare nelle prime 48 ore, ma a 72 ore la proliferazione cellulare era paragonabile a quella dei controlli non trattati (Figura 7).



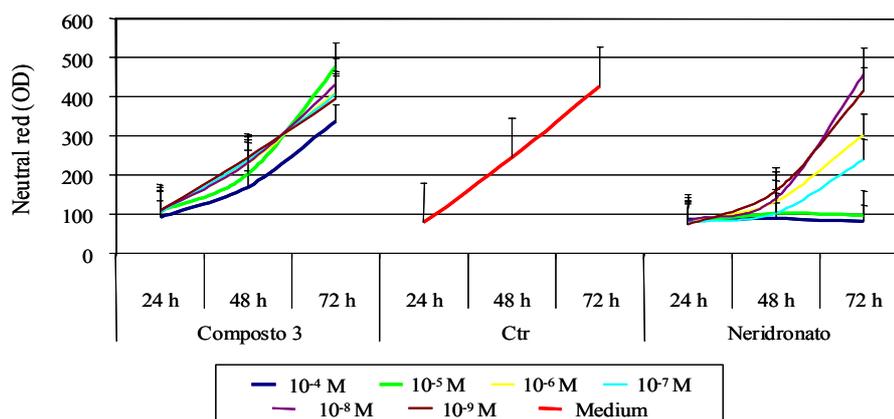


Figura 7. Andamento della citotossicità nel tempo (3 end-points: 24-48-72 ore) dei bisfosfonati (BP) di nuova sintesi rispetto al BP convenzionale (neridronato). OD = densità ottica.

Fra i bisfosfonati di nuova sintesi saggiati in questa serie di composti, il composto 1, oltre ad essere stato caratterizzato da una migliore relazione dose-risposta, è stato l'unico a mostrare alle 72 ore un andamento che rifletteva fortemente quello del bisfosfonato convenzionale, pur rivelandosi meno citotossico (Figura 8).

Sono state riscontrate alcune difficoltà riguardanti la solubilizzazione delle polveri dei bisfosfonati 2 e 3 in Phosphate Buffered Saline solution (PBS). La ridotta solubilità di un composto nel terreno di coltura rappresenta un limite importante per la valutazione dell'azione farmacologica dello stesso sugli osteoclasti, dal momento che i pre-osteoclasti sono cellule fagocitarie e la presenza di aggregati potrebbe stimolare l'attività di fagocitosi, interferendo in tal modo con il differenziamento cellulare. Per tale ragione, i composti 2 e 3 sono stati considerati non idonei per la verifica dell'attività anti-osteoclastica e sono stati esclusi dai successivi steps di analisi.

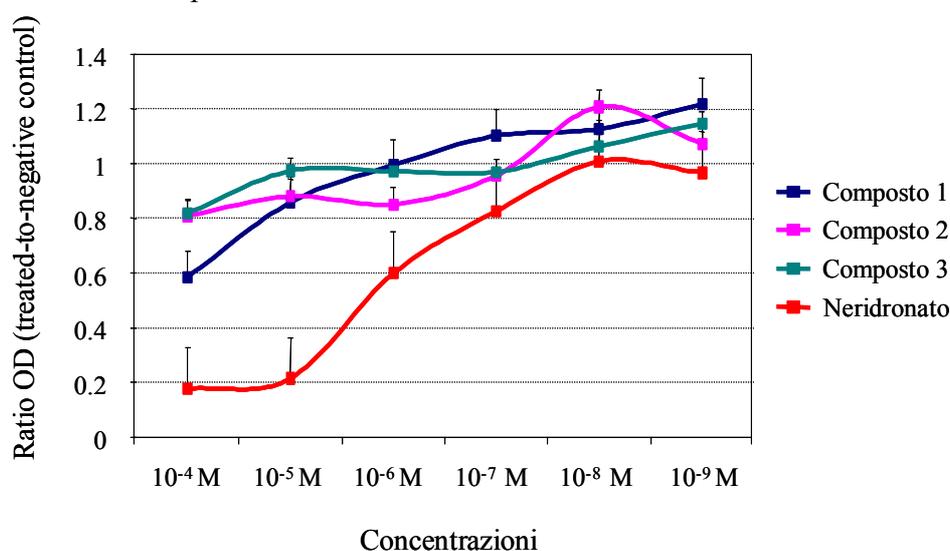


Figura 8. Vitalità cellulare a 72 ore: trattamento con i bisfosfonati (BP) di nuova sintesi vs condizione di controllo (cellule non trattate, OD = 1). OD = densità ottica.

Seconda serie di composti saggati: 7-8-9-10-11 confrontati con il pamidronato.

A 24 ore non è stato osservato alcun effetto citotossico da parte dei composti 7, 8, 9, 11. A differenza degli altri bisfosfonati, alle maggiori concentrazioni (10^{-4} e 10^{-5} M) e a tutti e tre gli end-points, il composto 9 ha mostrato un effetto citotossico sovrapponibile a quello esercitato dal bisfosfonato di controllo (pamidronato) (Figura 9). Infine, la relazione dose-risposta è stata rispettata per ciascun bisfosfonato saggiato.

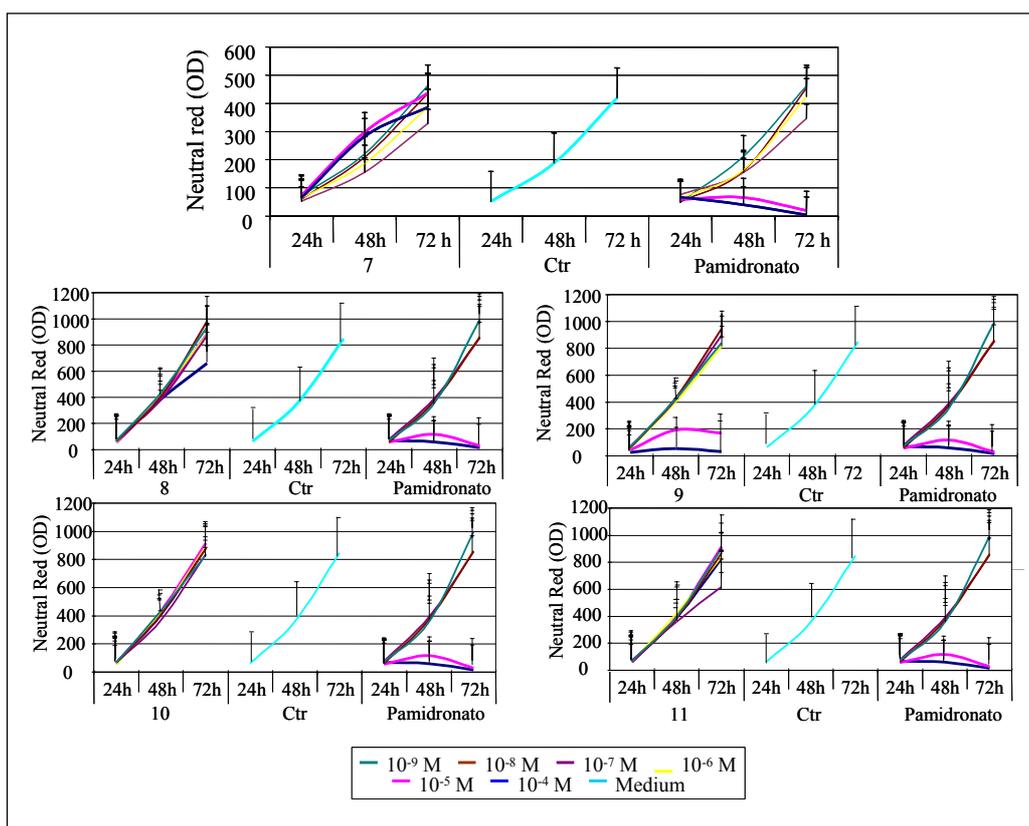


Figura 9. Andamento della citotossicità nel tempo (3 end-points: 24-48-72 h) dei bisfosfonati (BP) di nuova sintesi rispetto al BP convenzionale (pamidronato). OD = densità ottica.

Il grafico in Figura 10 mostra la ratio tra la densità ottica (OD) misurata nelle L929 trattate con i composti e quella misurata in cellule coltivate in condizioni standard, dopo 72 ore di coltura. I composti 7, 8, 10, 11 risultano significativamente meno citotossici degli altri composti (IC₅₀ non valutabile). Il pamidronato ed il bisfosfonato aromatico contenente N (composto 9) si comportano in modo sovrapponibile e riducono la sopravvivenza cellulare seguendo una relazione dose-risposta. Inoltre, alla concentrazione 10^{-4} M, il bisfosfonato aromatico contenente N (composto 7) e quello alifatico contenente N (composto 8) riducono la sopravvivenza cellulare più del bisfosfonato alifatico contenente S (composto 10) e dell'aromatico contenente S (composto 11).

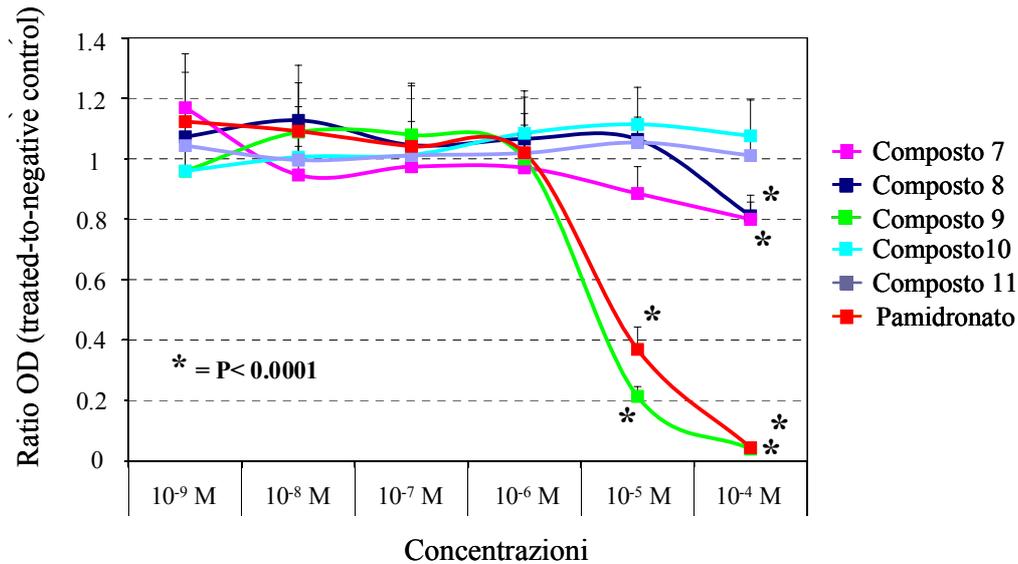


Figura 10. Vitalità cellulare a 72 h: trattamento con i bisfosfonati (BP) di nuova sintesi vs condizione di controllo (cellule non trattate). OD = densità ottica.

ANALISI DELL'ATTIVITÀ ANTI-OSTEOCLASTICA

È stato valutato il potenziale anti-osteoclastico dei bisfosfonati di nuova sintesi, inteso come effetto sulla formazione di nuovi osteoclasti (osteoclastogenesi), nell'indurre apoptosi degli osteoclasti maturi e sull'attività osteoclastica di degradazione del collagene umano di tipo I.

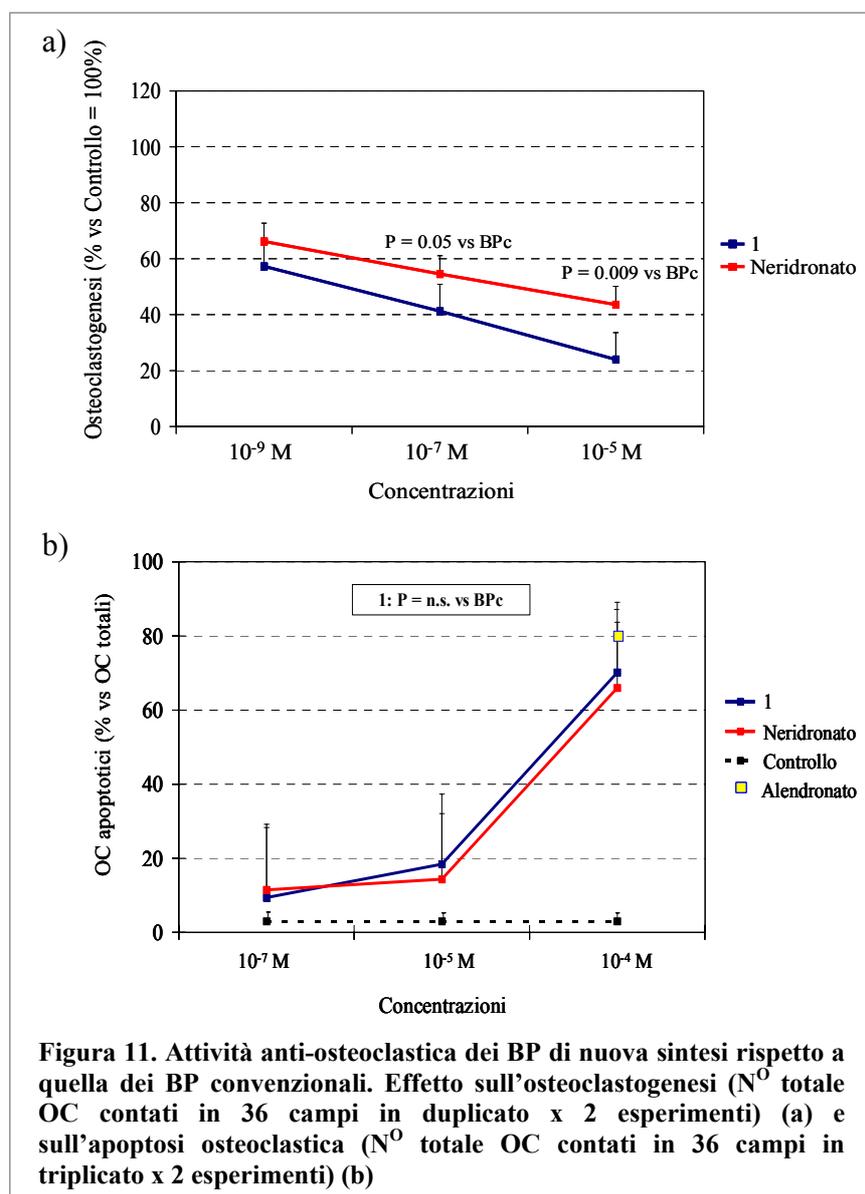
Le concentrazioni saggate (10^{-5} - 10^{-7} - 10^{-9} M) sono state selezionate in base ad alcune considerazioni. La concentrazione 10^{-5} M rappresenta la dose terapeutica di bisfosfonati convenzionalmente somministrata per via endovenosa. La concentrazione 10^{-7} M mima la quota di farmaco (pari all'1% della dose somministrata) che, una volta assorbita, raggiunge l'osso. La concentrazione 10^{-9} M è stata inclusa nella selezione delle dosi in quanto il sistema di coltura *in vitro* non prevede l'eliminazione del farmaco per via renale e dunque, nonostante tale concentrazione appaia piuttosto bassa, avrebbe potuto comunque esercitare un effetto biologico. Nel test di induzione dell'apoptosi le concentrazioni di farmaco utilizzate sono state maggiori (10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-7} M) rispetto a quelle impiegate negli esperimenti di valutazione dell'effetto sull'osteoclastogenesi. La concentrazione 10^{-4} M è stata inserita sulla base di alcune esperienze preliminari che avevano dimostrato l'attività pro-apoptotica di alendronato alla dose di 10^{-4} M, che è stato usato come controllo positivo di efficacia farmacologica (150). L'uso di concentrazioni più elevate è anche giustificato dal fatto che la

forte adesione degli osteoclasti maturi al substrato e la mancanza di una lacuna di riassorbimento ostacolano l'uptake del farmaco (202).

Prima serie di composti saggiati: composto 1 confrontato con il pamidronato, il neridronato e l'alendronato.

I risultati relativi al test atto a valutare l'effetto del bisfosfonato sull'osteoclastogenesi hanno mostrato che il bisfosfonato coniugato all'acido chenodesossicolico si è rivelato altamente efficace: alle concentrazioni 10^{-5} e 10^{-7} M ha inibito l'osteoclastogenesi in modo significativamente più elevato rispetto all'azione dei bisfosfonati convenzionali (Figura 11, pannello a).

Per quanto riguarda l'induzione dell'apoptosi osteoclastica, il composto 1 ha mostrato un effetto biologico sovrapponibile a quello del neridronato e, alla concentrazione 10^{-4} M, ha indotto un'apoptosi del 70% degli osteoclasti, percentuale molto vicina a quella riscontrata nella coltura di osteoclasti trattata con l'alendronato (Figura 11, pannello b).



Poiché il composto 1 si è dimostrato efficace nel bloccare il processo di osteoclastogenesi e nell'indurre l'apoptosi di osteoclasti maturi, è stato considerato idoneo per il proseguimento dello studio. Il grafico in Figura 12 mostra il rapporto tra l'intensità di fluorescenza, espressa in unità relative di fluorescenza (RFU), misurata nelle culture di osteoclasti trattate con il bisfosfonato di nuova sintesi e quella misurata in colture trattate con il solo terreno differenziante (colture di controllo, RFU = 1). Alla concentrazione 10^{-4} M il composto 1 era in grado di inibire la degradazione del collagene conservando il 90% dell'attività biologica dei bisfosfonati convenzionali.

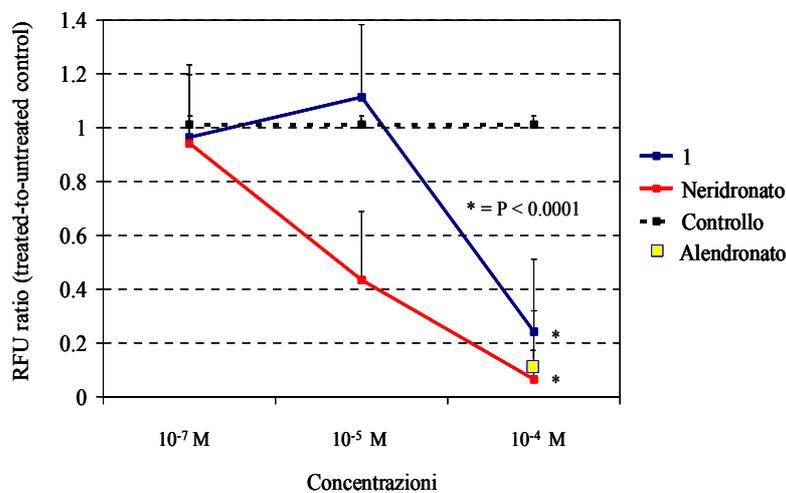


Figura 12. Effetto dei bisfosfonati di nuova sintesi sull'attività osteoclastica di degradazione del collagene di tipo I. Il grafico esprime il rapporto tra l'intensità di fluorescenza, espressa in *relative fluorescence units* (RFU), misurata nelle culture di osteoclasti trattate con il bisfosfonato di nuova sintesi e quella misurata in colture trattate con il solo terreno differenziante (colture di controllo, RFU = 1). Media \pm SEM di due esperimenti effettuati su osteoclasti isolati da due differenti donatori sani ed eseguiti in quadruplicato.

Seconda serie di composti saggiati: composti 7-8-9-10-11 confrontati con il pamidronato e l'alendronato.

I risultati relativi al test atto a valutare l'effetto dei bisfosfonati sull'osteoclastogenesi hanno mostrato che i composti 7, 8 e 10 hanno inibito l'osteoclastogenesi alla maggiore concentrazione non citotossica, mentre il composto 9 ha mostrato un effetto più potente di quello esercitato dal pamidronato, il bisfosfonato convenzionale. Lo stesso non si può dire per il bisfosfonato 11: il numero di osteoclasti riscontrati nella coltura cellulare trattata con questo bisfosfonato è risultato simile a quello osservato nella coltura di controllo. (Figura 13, pannello a).

Per quanto riguarda l'induzione apoptotica, alle più basse dosi tutti i bisfosfonati di nuova sintesi sono risultati più efficaci del bisfosfonato convenzionale; in particolare, mentre l'effetto pro-apoptotico del bisfosfonato convenzionale (pamidronato) scompariva alla concentrazione 10^{-5} M, quello osservato nelle colture cellulari trattate con il bisfosfonato aromatico contenente azoto (composto 9) ed il bisfosfonato alifatico contenente zolfo (composto 10) è risultato significativamente più elevato ($P < 0.0001$ e $P = 0.0007$, rispettivamente). Alla dose maggiore, tutti i nuovi bisfosfonati sono risultati pro-apoptotici, ed i bisfosfonati 9 e 10 si sono rivelati i più attivi (Figura 13, pannello b).

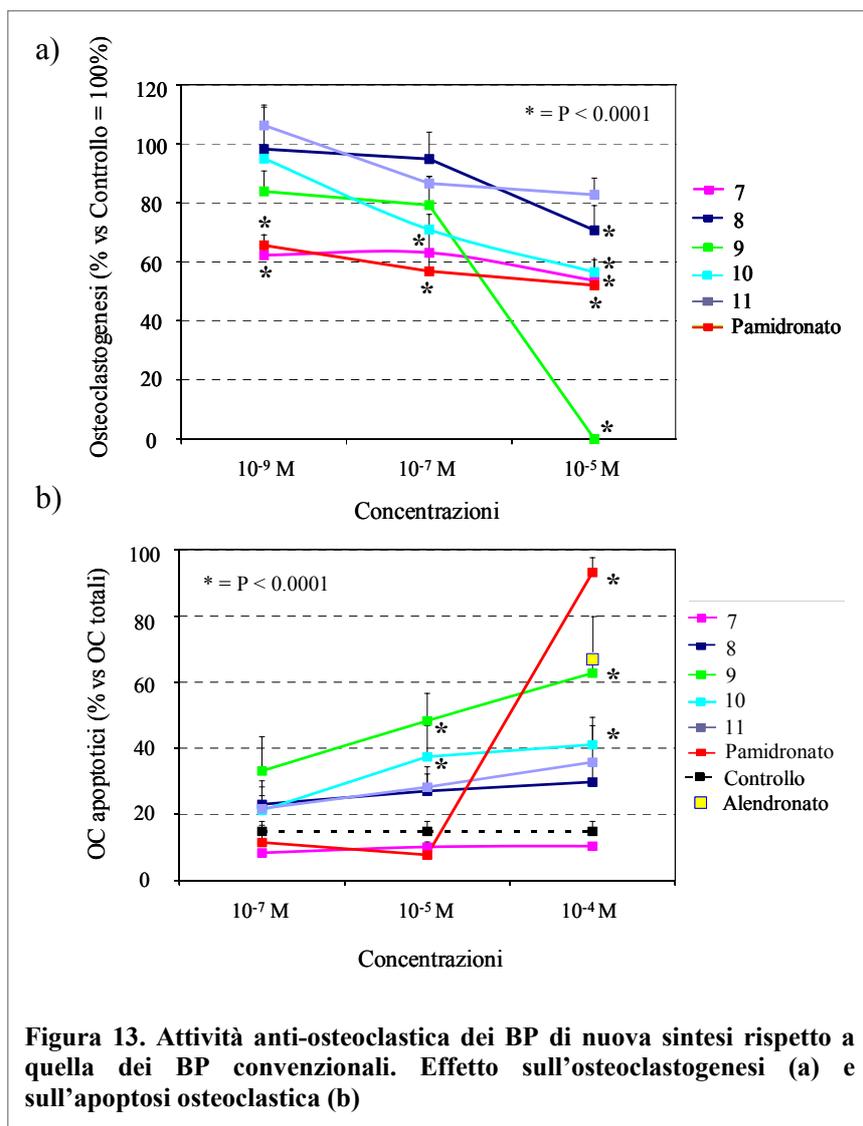


Figura 13. Attività anti-osteoclastica dei BP di nuova sintesi rispetto a quella dei BP convenzionali. Effetto sull'osteoclastogenesi (a) e sull'apoptosi osteoclastica (b)

Alla luce di tali risultati, per la continuazione dello studio, ovvero valutare l'efficacia nell'inibire la degradazione del collagene di tipo I, sono stati selezionati i composti 9 e 10.

Il saggio Osteolyse ha mostrato che i composti interferivano con l'attività osteoclastica di degradazione del collagene, inibendola alle maggiori concentrazioni. Inoltre, mentre l'attività del bisfosfonato 9 era presente a tutte le concentrazioni, quella del bisfosfonato di riferimento scompariva alla minore concentrazione. Infine, come mostrato in Figura 14, il composto 9 è risultato l'unico fra i due bisfosfonati ad aver conservato al 90% l'attività biologica dei substrati di base.

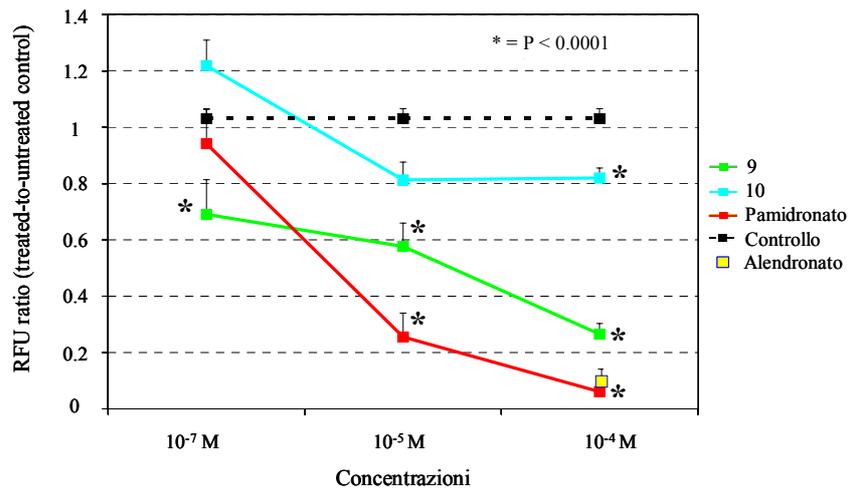


Figura 14. Effetto dei bisfosfonati di nuova sintesi sull'attività osteoclastica di degradazione del collagene di tipo I. Il grafico esprime il rapporto tra l'intensità di fluorescenza, espressa in *relative fluorescence units* (RFU), misurata nelle culture di osteoclasti trattate con i bisfosfonati di nuova sintesi e quella misurata in culture trattate con il solo terreno differenziante (culture di controllo, RFU = 1). Media \pm SEM di due esperimenti effettuati su osteoclasti isolati da due differenti donatori sani ed eseguiti in quadruplicato.

CONCLUSIONI

I bisfosfonati sono i farmaci d'elezione per il trattamento delle malattie da aumentato riassorbimento osseo. Essi inibiscono il riassorbimento mediato dagli osteoclasti esercitando un effetto sul differenziamento degli osteoclasti stessi (osteoclastogenesi), sul reclutamento degli osteoclasti maturi e sulla loro attività riassorbitiva, inibendo enzimi coinvolti nei processi di degradazione della matrice ossea o, semplicemente, inducendo alterazioni strutturali degli osteoclasti che li rendono impossibilitati a svolgere le loro funzioni abituali. Inoltre, sono in grado di indurre apoptosi degli osteoclasti differenziati.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare il potenziale anti-osteoclastico di bisfosfonati chimicamente innovativi, potenzialmente meno tossici e sintetizzati con strategie catalitiche semplificate ed ecocompatibili, in modo da ridurre notevolmente i costi di produzione.

Tutti i composti di nuova sintesi sono risultati meno citotossici rispetto ai bisfosfonati convenzionali, anche alle maggiori concentrazioni. Questo risultato ha consentito il passaggio alla fase di analisi successiva consistente nella valutazione dell'attività anti-osteoclastica. Gli unici bisfosfonati di nuova sintesi che, pur non essendosi rivelati citotossici, non sono stati selezionati per la verifica dell'attività biologica, sono stati i composti 2 e 3 per i problemi legati alla loro solubilità.

Poiché l'obiettivo del progetto era quello di ottenere farmaci non citotossici e capaci di conservare almeno il 90% della capacità dei substrati di base di inibire il riassorbimento osseo, i composti che hanno soddisfatto i requisiti previsti ed hanno dimostrato la migliore attività biologica in vitro sono stati i seguenti:

Composto 1. Nella prima serie di farmaci saggiati, il bisfosfonato 1 ha mostrato un effetto di inibizione dell'osteoclastogenesi significativamente più elevato rispetto a quello esercitato dai bisfosfonati convenzionali ed un'azione di induzione apoptotica sovrapponibile; inoltre, la maggiore concentrazione saggiata (10^{-4} M) ha inibito fortemente l'attività osteoclastica, conservando il 90% dell'attività biologica dei bisfosfonati di riferimento.

Dal punto di vista chimico, il composto 1 è particolarmente innovativo in quanto è un farmaco "ibrido" costituito da un acido biliare coniugato ad un bisfosfonato.

L'efficacia di un bisfosfonato dipende strettamente dalla biodisponibilità, che rappresenta una caratteristica critica di questi farmaci dal momento che si tratta di composti altamente idrofilici e, di conseguenza, difficilmente assorbibili a livello gastrointestinale in seguito a somministrazione orale (203). Le strategie per migliorare la biodisponibilità di farmaci

altamente idrofilici sono frequentemente basate sull'impiego di agenti chelanti, detergenti o acidi biliari (204, 205) o, più recentemente, impiegando capsule liposomiali (206) o nanoparticelle (207). L'acido biliare presenta proprietà molecolari che lo rendono potenzialmente sfruttabile per una vasta gamma di possibili applicazioni in chimica farmaceutica. In particolare, la contemporanea presenza al suo interno di una porzione idrofobica e di una porzione idrofilica, si ipotizza possa migliorare l'assorbimento gastrointestinale del composto al quale è coniugato, incrementando in tal modo la quota di farmaco destinata alla superficie ossea e riducendo gli effetti tossici associati alla somministrazione orale.

Sebbene dai nostri risultati questo bisfosfonato coniugato con acido chenodeossicolico risulti estremamente promettente, al momento non è possibile confrontarne la biodisponibilità con quella di bisfosfonati convenzionali. Tuttavia, studi paralleli hanno dimostrato l'elevata affinità del composto 1 per l'idrossiapatite dell'osso (198), e sono attualmente in corso studi *in vivo* allo scopo di valutare la farmacocinetica e la farmacodinamica del bisfosfonato in questione.

Nella seconda serie di farmaci, i bisfosfonati più efficaci sono risultati il 9 ed il 10. Le maggiori concentrazioni di 9 hanno indotto un'inibizione dell'osteoclastogenesi significativamente più elevata rispetto a quella esercitata dal bisfosfonato convenzionale. L'induzione apoptotica si è osservata alle concentrazioni 10^{-4} e 10^{-5} M, mentre per il bisfosfonato convenzionale era evidente solo alla concentrazione più elevata. Inoltre, a tutte le concentrazioni saggiate il composto ha inibito fortemente la degradazione del collagene umano di tipo I, conservando il 90% dell'attività biologica dei bisfosfonati convenzionali.

Alla maggiore concentrazione del composto 10 è stato osservato un effetto di inibizione dell'osteoclastogenesi. Come per il 9, l'induzione apoptotica si è osservata alle concentrazioni 10^{-4} e 10^{-5} M, mentre per il bisfosfonato convenzionale era evidente solo alla concentrazione più elevata. Il composto ha inibito fortemente la degradazione del collagene, solo alla maggiore concentrazione e in percentuale inferiore rispetto al bisfosfonato convenzionale.

Questa serie di composti è meno innovativa dal punto di vista chimico. In particolare, i composti contenenti azoto presentano molte analogie strutturali con i comuni amino-bisfosfonati. Tuttavia, la strategia di sintesi di questi composti è stata modificata rispetto a quella nota in letteratura, ed ha fornito rese quantitative migliori per tutti i bisfosfonati (208).

Maggiore attenzione deve essere rivolta ai bisfosfonati contenenti zolfo. Commercialmente questi farmaci sono già noti e ne è un esempio il tiludronato, ma a tutt'oggi sono scarsamente considerati e pochi autori ne descrivono gli effetti sulla attività degli

osteoclasti (209, 210, 211). Fra le sue funzioni, vi è quella di inibire le pompe protoniche ATP-dipendenti localizzate a livello della membrana plasmatica degli osteoclasti (212). Tali pompe sono responsabili dell'acidificazione dello spazio tra gli osteoclasti e la superficie ossea e quindi favoriscono l'attività delle metalloproteinasi collagenolitiche. Tuttavia, il tiludronato è dotato di bassa potenza a livello cellulare ed una inferiore affinità minerale rispetto agli amino-bisfosfonati, ed il suo uso clinico è limitato al trattamento del morbo di Paget ed all'impiego nell'ambito dell'ortopedia veterinaria (213).

Negli ultimi tempi, la conoscenza sul meccanismo d'azione dei bisfosfonati contenenti zolfo è stata ampliata. Essi, come altri non amino-bisfosfonati, vengono metabolizzati nel citosol degli osteoclasti in analoghi dell'ATP che possono interferire con la fosforilazione, compromettendo l'attivazione e la disattivazione di enzimi regolatori che inducono apoptosi osteoclastica (201). Dati recenti hanno inoltre dimostrato che la posizione dello zolfo nella molecola di bisfosfonato potrebbe avere un ruolo fondamentale nel migliorare l'efficacia terapeutica del farmaco (214).

I risultati del presente studio hanno confermato che la struttura chimica del bisfosfonato svolge un ruolo importante nel determinare la sua attività farmacologica. L'efficacia dei composti saggiati, infatti, ha subito forti variazioni a seconda delle caratteristiche delle catene laterali R¹. Come atteso, il composto 9, essendo un bisfosfonato aromatico contenente azoto, è risultato molto attivo ma, parallelamente, ha dimostrato una notevole citotossicità. Al contrario, il composto 10 (bisfosfonato contenente zolfo), oltre a non essere citotossico, presenta anche una buona attività anti-osteoclastica.

In conclusione, in questa serie di bisfosfonati è stato identificato un farmaco potenzialmente interessante, il composto 10. Mentre la bassa tossicità dimostrata da questo bisfosfonato contenente zolfo non è inaspettata, la sua buona attività anti-osteoclastica è sorprendente. La semplice struttura di questo bisfosfonato potrebbe favorire ulteriori sviluppi nella sintesi e nelle applicazioni terapeutiche della classe dei bisfosfonati alifatici contenenti zolfo, con ricadute molto significative sulla semplificazione sintetica, sulla sostenibilità dei processi e, in ultima analisi, sui costi di produzione di questi composti.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Baron R. Anatomy and ultrastructure of of bone. In: Favus MJ Ed. Primer of the metabolic diseases and disorders of mineral metabolism. Lippincott Williams & Wilkins 1999;3-10.
- ² Canalis E, Centrella M, McCarthy TJ. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *Clin Invest.* 1988;*81*:1572-7.
- ³ Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, Rader JJ, Baylink DJ. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;*78*:3204-8.
- ⁴ Luisetto G, Camozzi V. La fisiopatologia dell'osteoporosi. *Riv It Ost Gin* 2005;*5*:243-250.
- ⁵ Chambers TJ. The origin of osteoclast. *Bone Mineral Res* 1989;*6*:1-22.
- ⁶ Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in human adult bone. *J Cell Biochem* 1994;*55*:273-286.
- ⁷ Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002;*30*:5-7.
- ⁸ Quinn JM, Gillespie MT. Modulation of osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;*328*:739-745.
- ⁹ Kukita T, Kukita A. Osteoclast differentiation antigen. *Histol Histopathol* 1996;*1*:821-830.
- ¹⁰ Suda T, Udagawa N, Nakamura I et al. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 1995;*17*:87S-91S.
- ¹¹ Suda T, Takahashi N. Origin of osteoclasts and the role of osteoblasts in osteoclast differentiation. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1991;*65*:261-270.
- ¹² Roodman GD. Osteoclast differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;*2*:389-409.
- ¹³ Loutit JF, Nisbet NW. The origin of osteoclasts. *Immunobiology* 1982;*161*:193-203.
- ¹⁴ Formigli L, Orlandini SZ, Benvenuti S, Masi L, Pinto A, Gattei V, Bernabei PA, Robey PG, Collin-Osdoby P, Brandi ML. In vitro structural and functional relationships between preosteoclastic and bone endothelial cells: a juxtacrine model for migration and adhesion of osteoclast precursors. *J Cell Physiol* 1995;*162*:199-204.
- ¹⁵ Delaissé JM, Engsig MT, Everts V et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin. Chim. Acta* 2000;*291*:223-34.
- ¹⁶ Rodan GA, Martin TJ: Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1981;*33*:349.
- ¹⁷ Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998;*93*:165-176.
- ¹⁸ Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; *95*:3597-3602.
- ¹⁹ Hofbauer LC, Khosla S, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 2000;*15*:2-12.
- ²⁰ Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *European J of Endocrinology* 1999;*141*:195-210.
- ²¹ Kostenuik PJ, Shalhoub V. Osteoprotegerin: a physiological inhibitor of bone resorption. *Curr PharmDes* 2001;*7*:613-35.

-
- ²² Bolon B, Shalhoub V, Kostenuik PJ, Campagnuolo G, Morony S, Boyle WJ, Zack D, Feige U. Osteoprotegerin, an endogenous antiosteoclast factor for protecting bone in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;*46*:3121-35.
- ²³ Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;*12*:1260-8.
- ²⁴ Takai H, Kanematsu M, Yano K. Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 1998;*273*:27091-27096.
- ²⁵ Dominici M, Pritchard C, Garlits JE. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;*101*:11761-11766.
- ²⁶ Huang L, Teng XY, Cheng YY. Expression of preosteoblast markers and Cbfa-1 and Osterix gene transcripts in stromal tumour cells of giant cell tumour of bone. *Bone* 2004;*34*:393-401.
- ²⁷ Gololobov VG, Deev RV. Stromal stem cells and osteoblastic cellular differon. *Morfologija* 2003;*123*:9-19.
- ²⁸ Melton LJ, Chrischilles EA, Cooper C. Perspective: how many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992;*7*:1005-10.
- ²⁹ International Osteoporosis Foundation. Epidemiology. Disponibile da <http://www.iofbonehealth.org/healthprofessionals/about-osteoporosis/epidemiology.html> [Ultimo accesso: 14 Gennaio 2013].
- ³⁰ Società Italiana di Reumatologia. Linee guida per la diagnosi, prevenzione e terapia dell'osteoporosi. Pavia: Edizioni Internazionali srl. Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche, 2006.
- ³¹ Adami S, Bertoldo F, Brandi ML. Linee guida per la diagnosi, prevenzione e terapia dell'osteoporosi. *Reumatismo* 2009;*61*:260-284.
- ³² Smith DM, Nance WE, Kang KW. Genetic factors in determining bone mass. *J Clin Invest* 1973;*52*:2800-2808.
- ³³ Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J Clin Invest* 1987;*80*:706-10.
- ³⁴ Kelly PJ, Hopper JL, Macaskill GT. Genetic factors in bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;*72*:808-813.
- ³⁵ Weinberg ED. Iron loading: a risk factor for osteoporosis. *Biometals* 2006;*19*:633-635.
- ³⁶ Lewiecki EM. Clinical applications of bone density testing for osteoporosis. *Minerva Med* 2005;*96*:317-30.
- ³⁷ Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. (WHO Technical Report Series, No. 843). Geneva: World Health Organization, 1994.
- ³⁸ De Waure C, Gualano MR, Cadeddu C. Approccio terapeutico all'osteoporosi: efficacia e sicurezza dei trattamenti disponibili. *IJPH - Year 9, Volume 8, Number 2, Suppl. 2*, 2011.
- ³⁹ Nuti R, Minisola S. Nuove prospettive nella terapia dell'osteoporosi: il ruolo dell'inibizione del RANK ligando. *Rivista della Società Italiana di Medicina Generale* N. 5, Ottobre 2010;15-25.
- ⁴⁰ Cotton CM. 1999. *Ethnobotany Principles and Applications*. John Wiley e Sons Ltd.
- ⁴¹ Cox PA. The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. *Ciba Foundation Symposium* 1994;*185*:25-36.
- ⁴² Subhaktha PK. Sārangadhara--his contribution in Ayurvēdic literature. *Bull Indian Inst Hist Med Hyderabad* 2005;*35*:47-60.

-
- ⁴³ Goyal RK, Singh J, Lal H. *Asparagus racemosus*--an update. *Indian J Med Sci* 2003;*57*:408-14.
- ⁴⁴ Anonymous. *The wealth of India: raw materials*, vol. IX. New Delhi: Publication & Information Directorate, Council of Scientific & Industrial Research;1972.
- ⁴⁵ Bopana N, Saxena S. *Asparagus racemosus*--ethnopharmacological evaluation and conservation needs. *J Ethnopharmacol* 2007;*110*:1-15.
- ⁴⁶ Sekine T, Ikegami F, Fukasawa N, Kashiwagi Y, Aizawa T, Fujii Y, Ruangrunsi N, Murakoshi I. Structure and relative stereochemistry of a new polycyclic alkaloid, asparagamine A, showing anti-oxytocin activity, isolated from *Asparagus racemosus*. *J Chem Soc, Perkin Trans* 1995;*1*:391-393.
- ⁴⁷ Sekine T, Fukasawa N, Murakoshi I, Ruangrunsi N. A 9,10-dihydrophenanthrene from *Asparagus racemosus*. *Phytochemistry* 1997;*44*:763-764.
- ⁴⁸ Dalvi SS, Nadkarni PM, Gupta KC. Effect of *Asparagus racemosus* (Shatavari) on gastric emptying time in normal healthy volunteers. *J Postgrad Med* 1990;*36*: 91-94.
- ⁴⁹ Kishore P, Pandey PN, Pandey SN, Dash S. Treatment of duodenal ulcer with *Asparagus racemosus* Linn. *J Res Indian Med Yog Homeo* 1980;*15*:409-415.
- ⁵⁰ Singh KP, Singh RH. Clinical trial on Satavari in duodenal ulcer disease. *J Res Ay Sid* 1986;*9*:155-159.
- ⁵¹ De B, Maiti RN, Joshi VK, Agrawal VK, Goel RK. Effect of some Sitavirya drugs on gastric secretion and ulceration. *Indian J Exp Biol* 1997;*35*:1084-1087.
- ⁵² Jetmalani MH, Sabins PB, Gaitonde BB. A study on the pharmacology of various extracts of Shatavari- *Asparagus racemosus* (Willd). *J Res Ind Med* 1967;*2*:1-10.
- ⁵³ Sholapurkar ML. Lactare for improving lactation. *Indian Practitioner* 1986;*39*:1023-1026.
- ⁵⁴ Narendranath KA, Mahalingam S, Anuradha V, Rao IS. Effect of herbal galactogogue (Lactare) a pharmacological and clinical observation. *Med Surg* 1986;*26*:19-22.
- ⁵⁵ Patel AB, Kanitkar UK. *Asparagus racemosus* Willd. Form Bordi, as a galactogogue, in buffaloes. *Indian Vet J* 1969;*46*:718-721.
- ⁵⁶ Sabins PB, Gaitonde BB, Jetmalani M. Effect of alcoholic extract of *Asparagus racemosus* on mammary glands of rats. *Indian J Exp Biol* 1968;*6*:55-57.
- ⁵⁷ Dahanukar S, Thatte U, Pai N, Mose PB, Karandikar SM. Protective effect of *Asparagus racemosus* against induced abdominal sepsis. *Indian Drugs* 1986;*24*:125-128.
- ⁵⁸ Thatte U, Chhabria S, Karandikar SM, Dahanukar S. Immunotherapeutic modification of *E. coli* induced abdominal sepsis and mortality in mice by Indian medicinal plants. *Indian Drugs* 1987;*25*:95-97.
- ⁵⁹ Muruganadan S, Garg H, Lal J, Chandra S, Kumar D. Studies on the immunostimulant and antihepatotoxic activities of *Asparagus racemosus* root extract. *J Med Arom Pl Sci* 2000;*22*:49-52.
- ⁶⁰ Chopra RN, Chopra IC, Handa KL, Kapur LD. *Indigenous drugs of India*, Calcutta: Academic Publishers 1994;496.
- ⁶¹ Sharma PC, Yelne MB, Dennis TJ. *Data base on medicinal plants used in Ayurveda*. Delhi: Documentation & publication Division, Central Council for Research in Ayurveda & Siddha 2000;*1*:418-430.
- ⁶² "Emblica" *Indian Pharmaceutical Codex* 19531;56.
- ⁶³ Jacob A, Pandey M, Kapoor S, Saroja R. Effect of the Indian gooseberry (amla) on serum cholesterol levels in men aged 35-55 years. *Eur J Clin Nutr* 1988;*42*:939-44.
- ⁶⁴ Arora S, Kaur K, Kaur S. Indian medicinal plants as a reservoir of protective phytochemicals. *Teratog Carcinog Mutagen* 2003;Suppl 1:295-300.
- ⁶⁵ Sabu MC, Kuttan R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacol* 2002;*81*:155-60.

-
- ⁶⁶ Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol* 2000;*71*:23-43.
- ⁶⁷ Manjunatha S, Jaryal AK, Bijlani RL, Sachdeva U, Gupta SK. Effect of Chyawanprash and vitamin C on glucose tolerance and lipoprotein profile. *Indian J Physiol Pharmacol* 2001;*45*:71-9.
- ⁶⁸ Bhattacharya SK, Bhattacharya D, Muruganandam AV. Effect of *Emblica officinalis* tannoids on a rat model of tardive dyskinesia. *Indian J Exp Biol* 2000;*38*:945-7.
- ⁶⁹ Bhattacharya A, Chatterjee A, Ghosal S, Bhattacharya SK. Antioxidant activity of active tannoid principles of *Emblica officinalis* (amla). *Indian J Exp Biol* 1999;*37*:676-80.
- ⁷⁰ Khopde SM, Priyadarsini KI, Mohan H. Characterizing the antioxidant activity of amla (*Phyllanthus Emblica*) extract. *Current Science* 2001;*81*:185-190.
- ⁷¹ Ghosal S, Tripathi VK, Chauhan S. Active constituents of *Emblica officinalis* : Part 1. The chemistry and antioxidative effect of two new hydrolysable tannins, Emblicanin A and B. *Indian J Chem* 1996;*35B*:941-8.
- ⁷² Bhattacharya A, Kumar M, Ghosal S, Bhattacharya SK. Effect of bioactive tannoid principles of *Emblica officinalis* on iron-induced hepatic toxicity in rats. *Phytomed* 2000;*7*:173-5.
- ⁷³ Chaudhuri RK. *Emblica* cascading antioxidant: a novel natural skin care ingredient. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002;*15*:374-80.
- ⁷⁴ Zhang YJ, Tanaka T, Yang CR, Kouno I. New phenolic constituents from the fruit juice of *Phyllanthus emblica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001;*49*:537-40.
- ⁷⁵ Deep G, Dhiman M, Rao AR, Kale RK. Chemopreventive potential of Triphala (a composite Indian drug) on benzo(a)pyrene induced forestomach tumorigenesis in murine tumor model system. *J Exp Clin Cancer Res* 2005;*24*:555-63.
- ⁷⁶ Sancheti G, Jindal A, Kumari R, Goyal PK. Chemopreventive action of *Emblica officinalis* on skin carcinogenesis in mice. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005;*6*:197-201.
- ⁷⁷ Sandhya T, Lathika KM, Pandey BN, Mishra KP. Potential of traditional ayurvedic formulation, Triphala, as a novel anticancer drug. *Cancer Lett* 2006;*231*:206-14.
- ⁷⁸ Kaur S, Michael H, Arora S, Härkönen PL, Kumar S. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala--an Indian herbal drug. *J Ethnopharmacol* 2005;*97*:15-20.
- ⁷⁹ Rajeshkumar NV, Pillai MR, Kuttan R. Induction of apoptosis in mouse and human carcinoma cell lines by *Emblica officinalis* polyphenols and its effect on chemical carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 2003;*22*:201-12.
- ⁸⁰ Suryanarayan P, Saraswat M, Petrash JM, Reddy GB. *Emblica officinalis* and its enriched tannoids delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. *Mol Vis* 2007;*13*:1291-7.
- ⁸¹ Suryanarayana P, Kumar PA, Saraswat M, Petrash JM, Reddy GB. Inhibition of aldose reductase by tannoid principles of *Emblica officinalis*: implications for the prevention of sugar cataract. *Mol Vis* 2004;*10*:148-54.
- ⁸² Bhattacharya A, Kumar M, Ghosal S, Bhattacharya SK. Effect of bioactive tannoid principles of *Emblica officinalis* on iron-induced hepatic toxicity in rats. *Phytomedicine* 2000;*7*:173-5.
- ⁸³ Pramyothin P, Samosorn P, Pongshompoo S, Chaichantipyuth C. The protective effects of *Phyllanthus emblica* Linn. extract on ethanol induced rat hepatic injury. *J Ethnopharmacol* 2006;*107*:361-4.
- ⁸⁴ Jose JK, Kuttan R. Hepatoprotective activity of *Emblica officinalis* and Chyavanaprash. *J Ethnopharmacol* 2000;*72*:135-40.
- ⁸⁵ Rajak S, Banerjee SK, Sood S, Dinda AK, Gupta YK, Guptaand SK, Maulik SK. *Emblica officinalis* causes myocardial adaptation and protects against oxidative stress in ischemic-reperfusion injury in rats. *Phytother Res* 2004;*18*:54-60.

-
- ⁸⁶ Bafna PA, Balaraman R. Anti-ulcer and anti-oxidant activity of pepticare, a herbomineral formulation. *Phytomedicine* 2005;12:264-70.
- ⁸⁷ Yokozawa T, Kim HY, Kim HJ, Okubo T, Chu DC, Juneja LR. Amla (*Emblica officinalis* Gaertn.) prevents dyslipidaemia and oxidative stress in the ageing process. *Br J Nutr* 2007;97:1187-95.
- ⁸⁸ Kumaran A, Karunakaran RJ. Nitric oxide radical scavenging active components from *Phyllanthus emblica* L. *Plant Foods Hum Nutr* 2006;61:1-5.
- ⁸⁹ Scartezzini P, Antognoni F, Raggi MA, Poli F, Sabbioni C. Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Emblica officinalis* Gaertn. *J Ethnopharmacol* 2006;104:113-8.
- ⁹⁰ Bhattacharya A, Ghosal S, Bhattacharya SK. Antioxidant activity of tannoid principles of *Emblica officinalis* (amla) in chronic stress induced changes in rat brain. *Indian J Exp Biol* 2000;38:877-80.
- ⁹¹ Rao TP, Sakaguchi N, Juneja LR, Wada E, Yokozawa T. Amla (*Emblica officinalis* Gaertn.) extracts reduce oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* 2005;8:362-8.
- ⁹² Chaudhuri RK. *Emblica* cascading antioxidant: a novel natural skin care ingredient. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002;15:374-80.
- ⁹³ Srikumar R, Parthasarathy NJ, Sheela DR. Immunomodulatory activity of triphala on neutrophil functions. *Biol Pharm Bull* 2005;28:1398-403.
- ⁹⁴ Ganju L, Karan D, Chanda S, Srivastava KK, Sawhney RC, Selvamurthy W. Immunomodulatory effects of agents of plant origin. *Biomed Pharmacother* 2003;57:296-300.
- ⁹⁵ Nemmani KV, Jena GB, Dey CS, Kaul CL, Ramarao P. Cell proliferation and natural killer cell activity by polyherbal formulation, Immu-21 in mice. *Indian J Exp Biol* 2002;40:282-7.
- ⁹⁶ Sai RM, Neetu D, Yogesh B, Anju B, Dipti P, Pauline T, Sharma SK, Sarada SK, Ilavazhagan G, Kumar D, Selvamurthy W. Cyto-protective and immunomodulating properties of Amla (*Emblica officinalis*) on lymphocytes: an in-vitro study. *J Ethnopharmacol* 2002;81:5-10.
- ⁹⁷ Perianayagam JB, Sharma SK, Joseph A, Christina AJ. Evaluation of anti-pyretic and analgesic activity of *Emblica officinalis* Gaertn. *J Ethnopharmacol* 2004;95:83-5.
- ⁹⁸ Sai RM, Neetu D, Deepti P, Vandana M, Ilavazhagan G, Kumar D, Selvamurthy W. Cytoprotective activity of Amla (*Emblica officinalis*) against chromium (VI) induced oxidative injury in murine macrophages. *Phytother Res* 2003;17:430-3.
- ⁹⁹ Nosál'ová G, Mokry J, Hassan KM. Antitussive activity of the fruit extract of *Emblica officinalis* Gaertn. (Euphorbiaceae). *Phytomedicine* 2003;10:583-9.
- ¹⁰⁰ Al Rehaily AJ, Al Howiriny TA, Al Sohaibani MO, Rafatullah S. Gastroprotective effects of 'Amla' *Emblica officinalis* on in vivo test models in rats. *Phytomedicine* 2002;9:515-22.
- ¹⁰¹ Vasudevan M, Parle M. Effect of Anwala churna (*Emblica officinalis* Gaertn.): an ayurvedic Triphala-an Ayurvedic preparation on memory deficit rats. *Yakugaku Zasshi* 2007;127:1701-7.
- ¹⁰² Vasudevan M, Parle M. Memory enhancing activity of Anwala churna (*Emblica officinalis* Gaertn.): an Ayurvedic preparation. *Physiol Behav* 2007;91: 46-54.
- ¹⁰³ Mongre PK, Haldar D, Beri S. Evaluation of Ophthacare eye drops-a herbal formulation in the management of various ophthalmic disorders. *Phytother Res* 2001;15:618-20.
- ¹⁰⁴ Kim HJ, Yokozawa T, Kim HY, Tohda C, Rao TP, Juneja LR. Influence of amla (*Emblica officinalis* Gaertn.) on hypercholesterolemia and lipid peroxidation in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2005;51:413-8.
- ¹⁰⁵ Anila L, Vijayalakshmi NR. Flavonoids from *Emblica officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidemia. *J Ethnopharmacol* 2002;79:81-7.

-
- ¹⁰⁶ Srikumar R, Parthasarathy NJ, Shankar EM, Manikandan S, Vijayakumar R, Thangaraj R, Vijayananth K, Sheela DR, Rao UA. Evaluation of the growth inhibitory activities of Triphala against common bacterial isolates from HIV infected patients. *Phytother Res* 2007;21:476-80.
- ¹⁰⁷ Saeed S, Tariq P. Antibacterial activities of *Emblica officinalis* and *Coriandrum sativum* against Gram negative urinary pathogens. *Pak J Pharm Sci* 2007;20:32-5.
- ¹⁰⁸ Kaur S, Arora S, Kaur K, Kumar S. The in vitro antimutagenic activity of Triphala—an Indian herbal drug. *Food Chem Toxicol* 2002;40:527-34.
- ¹⁰⁹ Penolazzi L, Lampronti I, Borgatti M, Khan MT, Zennaro M, Piva R, Gambari R. Induction of apoptosis of human primary osteoclasts treated with extracts from the medicinal plant *Emblica officinalis*. *BMC Complement Altern Med* 2008;8:59.
- ¹¹⁰ Anonymous, the useful plants of India. CSIR, New Delhi, India 1986.
- ¹¹¹ Nadkarni AN. Indian Material Medica. Popular Book Depot, Bombay, India 1989.
- ¹¹² Mukherjee B. The indian pharmaceutical codex. Indigenous drugs 1953;vol. II.
- ¹¹³ Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC. Glossary of Indian Medicinal Plants. CSIR, New Dheli, India 1956.
- ¹¹⁴ Kirthikar KR, Basu BD. Indian medicinal plants 1980. Vol 1-4.
- ¹¹⁵ Subramanian SS, Nair AGR. Flavonoids of some Asclepiadaceous plants. *Phytochemistry* 1968;7:1703-1704.
- ¹¹⁶ Daniel M, Sabins SD e Mani NV. Estimation of tannins in some of the forest resources of Gujarat. *Indian J For* 1978;1:223.
- ¹¹⁷ Mandal S, Das PC, Joshi PC, Das A, Chatterjee A. Hemidesmine, a new cumarino lignoid from *Hemidesmus indicus*. *R Br Indian J Chem* 1991;30:712-713.
- ¹¹⁸ Mandal S, Das PC, Joshi PC, e Chatterjee A. Chemistry of coumarinolignoids, a rare class of plant products having anti-cancer and anti hepatotoxic activities. *Proceeding Seminar on Research in Ayurveda and Siddha. CCRAS, New Delhi* 1995.
- ¹¹⁹ Iddamaldeniya SS, Wickramasinghe N, Thabrew I, Ratnatunge N, Thammitiyagodage MG. Protection against diethylnitrosoamine-induced hepatocarcinogenesis by an indigenous medicine comprised of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* e *Smilax glabra*: a preliminary study. *J Carcino* 2003;2:6.
- ¹²⁰ Thabrew MI, Mitry RR, Morsy MA, Hughes RD. Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells. *Life sci* 2005;77:1319-1330.
- ¹²¹ Lampronti I, Khan MT, Bianchi N, Ather A, Borgatti M, Vizziello L, Fabbri E, Gambari R. Bangladeshi medicinal plant extracts inhibiting molecular interactions between nuclear factors and target DNA sequences mimicking NF-kappaB binding sites. *Med Chem* 2005;1:327-333.
- ¹²² Sultana S, Khan N, Sharma S, Alam A. Modulation of biochemical parameters by *Hemidesmus indicus* in cumene hydroperoxide-induced murine skin: Possible role in protection against free radicals-induced cutaneous oxidative stress and tumor promotion. *J Ethnopharmacol* 2003;85:33-41.
- ¹²³ Bopanna KN, BhagyaLakshmi N, Rathod SP, Balaraman R, Kannan J. Cell culture derived *Hemidesmus indicus* in the prevention of hypercholesterolemia in normal and hyperlipidaemic rats. *Indian J Pharmacol* 1997;29:105-109.
- ¹²⁴ Satoskar RS, Shah LG, Bhatt K, Sheth UK. Preliminary study of pharamacologic properties of Anantmul (*Hemidesmus indicus*). *Indian J Physiol Pharmacol* 1962;6:68-76.
- ¹²⁵ Kotnis MS, Patel P, Menon SN, Sane RT. Renoprotective effect of *Hemidesmus indicus*, a herbal drug used in gentamicin-induced renal toxicity. *Nephrology (Carlton)* 2004;9:142-152.

- ¹²⁶ Anoop Austin, Jegadeesan M. Biochemical studies on the anti-ulcerogenic potential of *Hemidesmus indicus* var. *indicus* R. Br. J Ethnopharmacol 2003;84:149-156.
- ¹²⁷ Anoop Austin, Jegadeesan M. Anti-ulcer potential of *Hemidesmus indicus* var. *pubescens* R. Br. Hamdard Medicus 2003;46:62-69.
- ¹²⁸ Ravishankara MN, Shrivastava N, Padh H, Rajani M. Evaluation of antioxidant properties of root bark of *Hemidesmus indicus* R. Br. (Anantmul). Phytomedicine 2002;9:153-160.
- ¹²⁹ Mary NK, Achuthan CR, Babu BH, Padikkala J. *In vitro* antioxidant and antithrombotic activity of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. J Ethnopharmacol 2003;87:187-191.
- ¹³⁰ Dutta MK, Sen TK, Sikdar S. Some preliminary observations on the anti-inflammatory properties of *Hemidesmus indicus* in rat. Indian J Pharmacol 1982;14:78.
- ¹³¹ Verma PR, Joharapurkar AA, Chatpalliwar VA, Asnani AJ. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. J Ethnopharmacol 2005;102:298-301.
- ¹³² Dymock W, Warden CJH, Hooker D. Pharmacographia Indica: a history of the principal drugs of vegetable origin met with in British India. Trebner and Co. Ltd 1890;221-222.
- ¹³³ Khory RN, Khatrak NN. Materia Medica of India and Their Therapeutics. Neeraj Publishing House 1985;343.
- ¹³⁴ Nadkarni KM. Bombay Popular Prakashan. The Indian Materia Medica (Bombay) 2000;1075-1077.
- ¹³⁵ Morita H, Yamamiya T, Takeya K, Itokawa H. New antitumor bicyclic hexapeptides, RA-XI, -XII, -XIII and -XIV from *Rubia cordifolia*. Chem Pharm Bull (Tokyo)1992;40:1352-4.
- ¹³⁶ Wang SX, Hua HM, Wu LJ, Li X, Zhu TR. Studies on Anthraquinones from the roots of *Rubia cordifolia* Linn. YaqXueXueBao 1992;27:743-7.
- ¹³⁷ Hassanean HA, Ibraheim ZZ, Takeya K, Itorawa H. Further quinoidal derivatives from *Rubia cordifolia* L. Pharmazie 2000;55:317-9.
- ¹³⁸ Chang LC, Chavez D, Gills JJ, Fong HHS, Pezzuto JM, Kinghorn AD Rubiasins A-C new anthracene derivatives from the roots and stem of *Rubia cordifolia*. Tetrahedron letters 2005;41:715-716.
- ¹³⁹ Miyazawa M, Kawata J. Identification of the key aroma compounds in dried roots of *Rubia cordifolia* Linn. Journal of Oleo-Science 2006;55:37-39.
- ¹⁴⁰ Son JK, Jung SJ, Jung JH, Fang Z, Lee CS, Seo CS, Moon DC, Min BS, Kim MR, Woo MH. Anticancer constituents from the roots of *Rubia cordifolia* Linn. Chem Pharm Bull 2008;56:213-216.
- ¹⁴¹ Tripathi YB, Sharma M. Comparison of the Antioxidant action of the alcoholic extract of *Rubia cordifolia* Linn. with Rubiadin. Indian J Biochem Biophys 1998;35:313-6.
- ¹⁴² Tripathi YB, Sharma M, Manickam M. Rubiadin, a new antioxidant from *Rubia cordifolia* Linn. Indian J Biochem Biophys 1997;34:302-6.
- ¹⁴³ Pandey S, Sharma M, Chaturvedi P, Tripathi YB. Protective effect of *Rubia cordifolia* on Lipid Peroxidation formation in isolated rat liver homogenate : an Indigenous medicinal plant. J Pak Med Assoc 1994;44:82-5.
- ¹⁴⁴ Somani R, Vadnere G, Jain K, Singhai AK. Effect of *Rubia cordifolia* Linn. on blood glucose level and glucose utilization by isolated rat hemidiaphragm. Indian Journal of Pharmacology 2006;38:76.
- ¹⁴⁵ Patil RA, Jagdale SC, Kasture SB. Antihyperglycemic, anti-stress and nootropic activity of roots of *Rubia cordifolia* Linn. Indian j Exp Biol. 2006;44:987-92.
- ¹⁴⁶ Kasture VS, Deshmukh BVK, Chopde CT. Anti-convulsant and behavioral actions of triterpene isolated from *Rubia cordifolia* Linn. Indian J Exp Biol 2000;38:675-80.

- ¹⁴⁷ Gilani AH, Janbaz KH, Zaman M, Lateef A, Suria A, Ahmed HR. Possible presence of calcium channel blocker(s) in *Rubia cordifolia*: an indigenous medicinal plant. *J Pak Med Assoc* 1994;*44*:82-5.
- ¹⁴⁸ Tripathi YB, Pandey S, Shukla SD. Anti-platelet activating factor property of *Rubia cordifolia*. *Indian J Exp Biol* 1993;*31*:533-5.
- ¹⁴⁹ Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J Biol Chem* 1927;*27*:627-650.
- ¹⁵⁰ Cenni E, Avnet S, Granchi D, Fotia C, Salerno M, Micieli D, Sarpietro MG, Pignatello R, Castelli F, Baldini N. The Effect of Poly(d,l-Lactide-co-Glycolide)-Alendronate Conjugate Nanoparticles on Human Osteoclast Precursors. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2011. [Epub ahead of print].
- ¹⁵¹ Rosarin FS, Arulmozhi V, Nagarajan S, Mirunalini S. Antiproliferative effect of silver nanoparticles synthesized using amla on Hep2 cell line. *Asian Pac J Trop Med* 2013;*6*:1-10.
- ¹⁵² Kato T, Suzumura Y, Takamoto S, Ota K. Antitumor activity and toxicity in mice of RA-700, a cyclic hexapeptide. *Anticancer Res* 1987;*7*:329-34.
- ¹⁵³ Fimognari C, Lenzi M, Ferruzzi L, Turrini E, Scartezzini P, Poli F, Gotti R, Guerrini A, Carulli G, Ottaviano V, Cantelli-Forti G, Hrelia P. Mitochondrial pathway mediates the antileukemic effects of *Hemidesmus indicus*, a promising botanical drug. *PLoS One*. 2011;*6*:e21544.
- ¹⁵⁴ Miyazaki T, Iwasawa M, Nakashima T, Mori S, Shigemoto K, Nakamura H, Katagiri H, Takayanagi H, Tanaka S. Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption. *J Biol Chem* 2012;*287*:37808-23.
- ¹⁵⁵ Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 2011;*49*:2-19.
- ¹⁵⁶ Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol* 2012;*68*:1013-8.
- ¹⁵⁷ Coleman RE. Should bisphosphonates be the treatment of choice for metastatic bone disease? *Semin Oncol* 2001;*28*:35-41.
- ¹⁵⁸ Fleisch H, Russell RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966;*212*:901-3.
- ¹⁵⁹ Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2006;*38*:617-27.
- ¹⁶⁰ Russell RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 2006;*1068*:367-401.
- ¹⁶¹ Clézardin P, Ebetino FH, Fournier PG. Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Res* 2005;*65*:4971-4.
Hashimoto K et al, 2005
- ¹⁶² Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, Tahara M, Kawagishi R, Ikebuchi Y, Sakata M, Tasaka K, Murata Y. Alendronate inhibits intraperitoneal dissemination in in vivo ovarian cancer model. *Cancer Res* 2005;*65*:540-5.
- ¹⁶³ Giraudo E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* 2004;*114*:623-33.
- ¹⁶⁴ Nussbaum SR, Warrell RP Jr, Rude R, Glusman J, Bilezikian JP, et al. Dose response study of alendronate sodium for the treatment of cancer-associated hypercalcemia. *J Clin Oncol* 1993;*14*:268-76.
- ¹⁶⁵ Hughes DE, MacDonald BR, Russel RGG, Gowen M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest* 1991;*88*:2095-105.

- ¹⁶⁶ Boonekamp PM, van der Wee-Pals LJA, van Wijk-van Lennep MLL, Wil Thesing C, Bijvoet OLM. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *Bone Miner* 1986;*1*:27-39.
- ¹⁶⁷ L□wik CWGM, van der Pluijm G, van der Wee-Pals LJA, Bloys van Treslong-de Groot H, Bijvoet OLM. Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: the effect of a bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 1988;*3*:185-92.
- ¹⁶⁸ Papapoulos SE, Hoekman K, L□wik CWGM, Vermeji P, Bijvoet OLM. Application of an in vitro model and a clinical protocol in the assessment of the potency of a new bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 1988;*4*:775-81.
- ¹⁶⁹ Cecchini MG, Felix R, Fleisch H, Cooper PH. Effect of bisphosphonates on proliferation and viability of mouse bone marrow-derived macrophages. *J Bone Miner Res* 1987;*2*:135-142.
- ¹⁷⁰ Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse marrow cultures. *Endocrinology* 1988;*122*:1373-82.
- ¹⁷¹ Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugai N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 1996;*18*:9-14.
- ¹⁷² 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.
- ¹⁷³ Vitte C, Fleisch H, Guenther HL. Osteoblasts mediate the bisphosphonate inhibition of bone resorption through synthesis of an osteoclast-inhibiting activity. *J Bone Miner Res* 1994;*9*:S142.
- ¹⁷⁴ Ohya K, Yamada S, Felix R, Fleisch H. Effect of bisphosphonates on prostaglandin synthesis by rat bone cells and mouse calvaria in culture. *Clin Sci* 1985;*69*:403-11.
- ¹⁷⁵ Stronski SA, Bettscheu-camin L, Wetterwald A, Felix R, Trechsel U, Fleisch H. Bisphosphonates inhibit 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced increase of osteocalcin in plasma of rats in vivo and in culture medium. *Calcif Tissue Int* 1988;*42*:248-54.
- ¹⁷⁶ Vitte C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonate induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 1996;*137*:2324-33.
- ¹⁷⁷ 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.
- ¹⁷⁸ 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.
- ¹⁷⁹ Khokher MA, Dandona P. Diphosphonates inhibit human osteoblast secretion and proliferation. *Metabolism* 1989;*38*:184-7.
- ¹⁸⁰ Rehinolz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 2000;*60*:6001-7.
- ¹⁸¹ Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone* 1996;*19*:281-90.
- ¹⁸² Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000;*88*:2961-78.
- ¹⁸³ Sato M, Grasser W. Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. *J Bone Miner Res* 1990;*5*:31-40.
- ¹⁸⁴ Endo Y, Nakamura M, Kikuchi T, Shinoda H, Takeda Y, Nitta Y, Kumagai K. Aminoalkylbisphosphonates, potent inhibitors of bone resorption, induce a prolonged stimulation of histamine synthesis and increase macrophages, granulocytes, and osteoclasts *in vivo*.

-
- ¹⁸⁵ Schenk R, Merz WA, Mühlbauer R, Russel RGG, Fleisch H. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl₂ [scap]mDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Res* 1973;11:196-214.
- ¹⁸⁶ Miller SC, Jee WSS. The effect of dichloromethylenediphosphonate, a pyrophosphate analog, on bone and bone cell structure in the growing rat. *Anat Rec* 1979;193:439-462.
- ¹⁸⁷ Murakami H, Takahashi N, Tanaka S, Nakamura I, Udagawa N, Nakajo S. Tiludronate inhibits protein tyrosine phosphatase activity in osteoclasts. *Bone* 1997;20:399-404.
- ¹⁸⁸ Carano A, Teitelbaum SA, Konsek JD, Schlesinger PH, Blair HC. Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro. *J Clin Invest* 1990;85:456-61.
- ¹⁸⁹ Zimolo Z, Wesolowski G, Rodan GA. Acid extrusion is induced by osteoclast attachment to bone. *J Clin Invest* 1995;96:2277-83.
- ¹⁹⁰ Felix R, Russel RGG, Fleisch H. the effect of several diphosphonates on acid phosphohydrolases and other lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1976;429:429-38.
- ¹⁹¹ Lerner UH, Larsson A. Effects of four bisphosphonates on bone resorption, lysosomal enzyme release, protein synthesis and mitotic activities in mouse calvarial bones in vitro. *Bone* 1987;8:179-89.
- ¹⁹² Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, et al. A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone* 1995;17:137-144.
- ¹⁹³ Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Russell RGG, Croucher PJ. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cells: a novel anti-tumor activity. *Br J Haematol* 1997;98:665-72.
- ¹⁹⁴ Rogers MJ, Chilton KM, Coxon F, Lawry J, Smith MO, Suri S. Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells by a nitric-oxide-independent mechanism. *J Bone Miner Res* 1996;11:1482-91.
- ¹⁹⁵ Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998;13:581-9.
- ¹⁹⁶ Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70:401-10.
- ¹⁹⁷ Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992;70:389-99.
- ¹⁹⁸ Bortolini O, Fantin G, Fogagnolo M, Rossetti S, Maiuolo L, Di Pompo G, Avnet S, Granchi D, *Eur J Med Chem* 2012;52:221-229.
- ¹⁹⁹ Merlotti D, Gennari L, Martini G, Valleggi F, De Paola V, Avanzati A, Nuti R. Comparison of different intravenous bisphosphonate regimens for Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 2007;22:1510-1517.
- ²⁰⁰ Frediani B, Spreafico A, Capperucci C, Chellini F, Gambera D, Ferrata P, Baldi F, Falsetti P, Santucci A, Bocchi L, Marcolongo R. Long-term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures. *Bone* 2004;35:859-69.
- ²⁰¹ Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*. 2008;19:733-59.
- ²⁰² Thompson K, Rogers MJ, Coxon FP, Crockett JC. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol Pharmacol* 2006;69:1624-32.

-
- ²⁰³ Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008;**83**:1032-45.
- ²⁰⁴ Ezra A, Golomb G. Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;**42**:175-95.
- ²⁰⁵ Virtanen E, Kolehmainen E. Use of Bile Acids in Pharmacological and Supramolecular Applications. *Eur J Org Chem* 2004;**4**:3385-3399.
- ²⁰⁶ Shmeeda H, Amitay Y, Gorin J, Tzemach D, Mak L, Ogorka J, Kumar S, Zhang JA, Gabizon A. Delivery of zoledronic acid encapsulated in folate-targeted liposome results in potent in vitro cytotoxic activity on tumor cells. *J Control Release* 2010;**146**:76-83.
- Shmeeda H, Amitay Y, Gorin J, Tzemach D, Mak L, Ogorka J, Kumar S, Zhang JA, Gabizon A.
- ²⁰⁷ Dissette V, Bozzi P, Bignozzi CA, Dalpiaz A, Ferraro L, Beggiato S, Leo E, Vighi E, Pasti L. Particulate adducts based on sodium risedronate and titanium dioxide for the bioavailability enhancement of oral administered bisphosphonates. *Eur J Pharm Sci*. 2010;**41**:328-36.
- ²⁰⁸ Granchi D, Scarso A, Bianchini G, Chiminazzo A, Minto A, Sgarbossa P, Michelin RA, Di Pompo G, Avnet S, Strukul G. Low Toxicity and Unprecedented Anti-Osteoclast Activity of A Simple Sulphur Containing gem-Bisphosphonate: A Comparative Study. *Chem Med Chem, Submitted*.
- ²⁰⁹ Nugent RA, Schlachter ST, Murphy M, Dunn CJ, Staite ND, Galinet LA, Shields SK, Wu H, Aspar DG, Richard KA. Carbonyl-containing bisphosphonate esters as novel antiinflammatory and antiarthritic agents. *J Med Chem* 1994;**37**:4449-4454
- ²¹⁰ Abdou WM, Ganoub NA, Geronikaki A, Sabry E. Synthesis, properties, and perspectives of gem-diphosphono substituted-thiazoles. *Eur J Med Chem* 2008;**43**:1015-1024;
- ²¹¹ Tanaka KSE, Houghton TJ, Kang T, Dietrich E, Delorme D, Ferreira SS, Caron L, Viens F., Arhin FF, Sarmiento I, Lehoux D, Fadhil I, Laquerre K, Liu J, Ostiguy V, Poirier H, Moeck G, Parr Jr TR, Rafai Far A. Bisphosphonated fluoroquinolone esters as osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis. *Bioorg Med Chem* 2008;**16**:9217-9229.
- ²¹² David P, Nguyen H, Barbier A, Baron R. The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *J Bone Min Res* 1996;**11**:1498-1507.
- ²¹³ Kamm L, Mellwraith W, Kawcak C. A review of the efficacy of tiludronate in the horse. *J Equine Vet Sci* 2008;**28**:209-214.
- ²¹⁴ Rubino MT, Agamennone M, Campestre C, Campiglia P, Cremasco V, Faccio R, Laghezza A, Loiodice F, Maggi D, Panza E, Rossello A, Tortorella P. Biphenyl sulfonylamino methyl bisphosphonic acids as inhibitors of matrix metalloproteinases and bone resorption. *Chem Med Chem* 2011;**6**:1258-1268.