

Original Article

The Role of Myeloma Cells to Osteoclast Activation

Bahareh Sadeghi, M.Sc.¹, Saeid Abroun, Ph.D.^{1*}, Behzad Poopak, Ph.D.²,
Abbas Hajfathali, M.D.³, Najmeddin Saki, M.Sc.¹, Najmeh Vaghef, M.Sc.¹

1. Hematology Department, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
2. Hematology Department, Islamic Azad University, Tehran Medical Branch, Tehran, Iran
3. Hematology and Oncology Department, Shahid Beheshti Medical Sciences University, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Hematology Department, Faculty of Medical Science,
Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
Email: abroun@modares.ac.ir

Received: 21/Jun/2010, Accepted: 20/Sep/2010

Abstract

Objective: Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy characterized by osteolytic bone disease which is associated with severe bone pain and pathological bone fractures. The receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) system has an important role in regulation of bone remodeling process. The aim of this study was to evaluate the expression of the RANK/RANKL molecules by the myeloma cells derived from patients and myeloma cell line U-266.

Materials and Methods: Myeloma cells derived from 7 myeloma patients and plasma cell leukemia were included into this study to evaluate the expression of the RANK/RANKL molecules by the reverse transcriptions-polymerase chain reaction (RT-PCR) method at the mRNA level. As well as human myeloma cell line U266, U937, RPMI-8866 and Hela were used as control groups.

Results: In this study we show the expression of RANK and its ligand at the mRNA level in U-266 (myeloma cell line) and plasma cells derived from patients by the RT-PCR technique.

Conclusion: Our results demonstrate that expression of RANK and RANKL by plasma cells can contribute to induction of osteoclasts and plasma cell activation which elevates bone resorption in myeloma patients.

Keywords: Multiple Myeloma, Bone Disease, RANKL, RANK

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 357-366

نقش سلول‌های مایلومايي در فعاليت سلول‌های استئوکلاست

بهاره صادقی M.Sc.^۱، سعید آبرون Ph.D.^{۱*}، بهزاد پوپک Ph.D.^۲، عباس حاج‌فتحعلی M.D.^۲،
نجم‌الدین ساکی M.Sc.^۳، نجمه واقف M.Sc.^۳

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه خون‌شناسی و بانک خون، تهران، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده پیراپزشکی، تهران، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان طالقانی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه خون‌شناسی و بانک خون
پست الکترونیک: Email: abroun@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۹/۳/۳۱، پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۲۹

چکیده

* هدف: بررسی نقش سلول‌های مایلومايي در فعاليت سلول‌های استئوکلاست

* مواد و روش‌ها: در این مطالعه نمونه خون محیطی و مغزاستخوان ۷ بیمار مبتلا به مایلوما ولوسمی پلاسماسل و نیز ۴ نوع رده سلولی به عنوان نمونه کنترل از نظر بیان Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) و Receptor Activator of Nuclear Factor κ B ligand (RANKL) بررسی شد. RNA نمونه‌ها با استفاده از روش گوانیدین تیوسیانات از سلول‌های تک‌هسته‌ای به دست آمده از نمونه بیماران استخراج گردید. پس از انجام کنترل کیفی جهت ارزیابی وضعیت بیان RANK/RANKL از واکنش Reverse Transcriptions-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) استفاده شد.
* یافته‌ها: در این مطالعه با استفاده از تکنیک RT-PCR نشان داده شد که U-266 (رده سلول مایلومايي) و پلاسماسل‌های جدا شده از بیماران مبتلا به مالتیپل مایلوما RANK و RANKL رادر سطح mRNA بیان می‌کنند.
* نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که به احتمال زیاد بیان RANK و RANKL توسط پلاسماسل‌ها می‌تواند در القای فعاليت استئوکلاست‌ها و پلاسماسل‌ها و متعاقب آن افزایش تخریب استخوان در بیماران مبتلا به مایلوما نقش مهمی داشته باشد.

* کلیدواژگان: مالتیپل مایلوما، بیماری استخوانی، RANK، RANKL

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۶۸-۳۵۷

مقدمه

اختلالات پلاسماسل شامل طیف وسیعی از بیماری‌ها می‌باشند که برخی از آنها عبارتند از: مالتیپل مایلوما (Multiple Myeloma; MM)، مونوکلونال گاما پاتی با اهمیت نامشخص، آمیلویدوزیس اولیه و بیماری‌های زنجیره سبک و سنگین ایمونو گلوبولین (۱). از جمله مهم‌ترین ویژگی‌های این اختلالات، تکثیر و تجمع پلاسماسل‌های کلونال در مغز استخوان و حضور مقادیر و انواع متفاوتی از ایمونو گلوبولین مونوکلونال در سرم و یا ادرار بیماران می‌باشد (۲، ۳).

در میان اختلالات پلاسماسل، مالتیپل مایلوما (MM) دومین سرطان شایع خون پس از لنفوم می‌باشد. مالتیپل مایلوما بدخیمی مربوط به لنفوسیت‌های B تمایز یافته (پلاسماسل‌ها) می‌باشد. برخی از مهم‌ترین مشخصات این بیماری عبارتند از: تکثیر و تجمع پلاسماسل‌های کلونال در مغز استخوان، حضور ایمونو گلوبولین مونوکلونال در سرم و یا ادرار و ایجاد ضایعات استخوانی لیتیک در جمجمه، استخوان‌های لگن، ران و غیره. برخلاف دست‌یابی به پیشرفت‌های نوین درمانی، مالتیپل مایلوما همچنان به صورت یک بیماری غیرقابل درمان در نظر گرفته می‌شود.

هر سال حدود ۱۵۰۰۰ نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند. میانگین سنی در زمان تشخیص بین ۶۵-۶۰ سالگی می‌باشد، در زمان تشخیص کمتر از ۲ درصد، مبتلایان به مایلوما سن کمتر از ۴۰ سال دارند. این طور به نظر می‌رسد که مایلوما در مردان شایع‌تر از زنان می‌باشد. به طور کامل علت این امر مشخص نیست اما می‌تواند به دلیل اثرات هورمونی و شرایط کاری باشد. بیماران مبتلا به مایلوما دارای علائمی نظیر کم‌خونی، درد

استخوان، شکستگی‌های پاتولوژیک، خون‌ریزی، اختلالات عصبی و ناهنجاری کلیه می‌باشند. این عوارض به علت افزایش بار تومور و یا ترشح یک سری از سایتوکاین‌ها توسط پلاسماسل بدخیم ایجاد می‌شوند (۱، ۲).

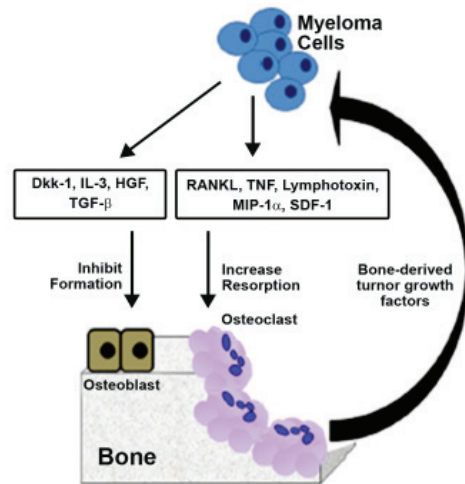
مالتیپل مایلوما به عنوان یک بیماری غیرقابل درمان در نظر گرفته می‌شود. اگر بیماران به صورت استاندارد درمان شوند، میزان بقای آنها به طور میانگین ۳ سال و در صورتی که تحت شیمی درمانی با دوز بالا یا پیوند قرار بگیرند، ۵ سال می‌باشد (۳).

تحقیقات نشان داده‌است که سلول‌های مایلومايي تعدادی از فاکتورهای فعال‌کننده استئوکلاست (Osteoclast Activating Factors; OAFs) را ترشح می‌کنند و از این طریق باعث افزایش شکل‌گیری و فعاليت استئوکلاست‌ها می‌شوند (۴، ۵). بعضی از این فاکتورها شامل لنفو توکسین، اینترلوکین ۳ (Interleukin-3; IL-3)، اینترلوکین ۱ (Interleukin-1; IL-1)، Macrophage (MIP-1 α)، Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)، Transforming Growth (TGF- β) و Inflammatory Protein-1 α Factor- β می‌باشند (۶، ۷) (شکل ۱). بررسی‌ها نشان داده‌است که واکنش‌های متقابل بین سلول‌های مایلومايي و سلول‌های استرومال نقش بسیار مهمی در ایجاد ضایعات استخوانی در مبتلایان به مایلوما دارند. در مطالعات جدید گزارش شده‌است که سیستم RANKL/RANK نقش مهمی در شکل‌گیری و فعاليت استئوکلاست‌ها دارد (۴، ۸، ۹). از طرفی محققین اظهار می‌کنند که اختلال در تنظیم سیستم RANK/RANKL می‌تواند نقش با اهمیتی در پاتوژنز بیماری استخوانی مبتلایان به مایلوما داشته باشد (۱۰، ۱۱).

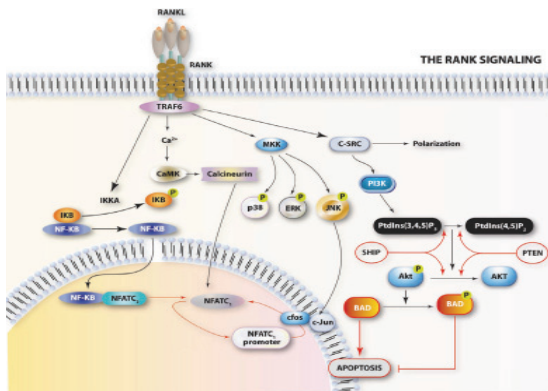
مالتیپل مایلوما و استئوکلاست

RANK signaling از طریق مسیرهای انتقال سیگنال متفاوت در تنظیم فعالیت استئوکلاستها نقش دارد که برخی از آنها عبارت هستند از:

۱. مسیر انتقال سیگنال NF-κB
 ۲. مسیر انتقال سیگنال JNK
 ۳. مسیر انتقال سیگنال AKT-PTK
- به دنبال اتصال RANKL به RANK مولکول TRAF ۶ به عنوان آداپتور به نواحی خاصی از دومن داخل سلولی RANK متصل می‌شود. در واقع دومن داخل سلولی مولکول RANK فاقد فعالیت آنزیماتیک بوده که جهت ادامه انتقال سیگنال از TRAF6 (TNF Receptor Aso-6) کمک به نقش سیستم RANKL در شکل‌گیری استئوکلاست‌نرمال به طور مختصر اشاره شد. طبق گزارش، تنظیم غیرطبیعی این سیستم می‌تواند باعث اختلالاتی از جمله لیز شدن استخوان باشد که می‌توان به بیماری‌ها مالیتیپل مایلوما اشاره کرد (۸، ۹، ۱۴).



شکل ۱: تصویر شماتیک مربوط به برخی از فاکتورهایی که در ایجاد درگیری استخوانی در مالیتیپل مایلوما نقش دارند.



شکل ۲: تصویر شماتیک مربوط به مسیر انتقال سیگنال RANK در سلول استئوکلاست <http://www.cellsignal.com>

فرض بر این است که حضور سلول‌های مایلومایی در ریز محیط مغز استخوان این بیماران باعث تغییر در میزان بیان RANK، RANKL و OPG شود که در نهایت باعث عدم توازن در بیان این مولکول‌ها شده است. در نتیجه بیان RANKL افزایش یافته و باعث افزایش شکل‌گیری استئوکلاست‌ها و متعاقب آن افزایش جذب استخوان یا همان تخریب استخوان می‌گردد (۱۵).

احتمال داده می‌شود که عدم توازن در بیان این مولکول‌ها و به خصوص RANKL از طریق این مسیرهایی که در ذیل به آنها اشاره شده است ایجاد شود:

۱. ممکن است سلول‌های مایلومایی موجود در مغز استخوان باعث افزایش بیان RANKL توسط برخی از سلول‌های موجود در ریز محیط مغز استخوان شده و به صورت غیرمستقیم باعث افزایش شکل‌گیری و فعالیت استئوکلاست‌ها و به دنبال آن افزایش جذب یا تخریب استخوان شود (۱۵، ۱۶).
 ۲. احتمال دیگری وجود دارد که سلول‌های مایلومایی، خود، به صورت مستقیم RANKL را بیان کنند و از این طریق باعث شکل‌گیری استئوکلاست‌ها و جذب استخوان شوند (۱۵، ۱۷).
- نظریه سوم بر این است که سلول‌های مایلومایی می‌توانند از طریق مهار تولید OPG (که به عنوان Decoy Receptor برای RANKL می‌باشد) نقش خود را ایفا کنند، در این صورت RANKL به جای اتصال به OPG به مولکول RANK اتصال می‌یابد و از این طریق باعث افزایش فعالیت و افزایش شکل‌گیری استئوکلاست‌ها می‌شود (۲۱-۱۸).

RANK یک پروتئین هموترایمیریک است و عضوی از TNF-Receptor Super Family می‌باشد. پیش‌ساز استئوکلاست، استئوکلاست بالغ، سلول دندرتیک و غدد پستانی این پروتئین را بیان می‌کنند. از طرفی RANK توسط برخی از سلول‌های توموری مانند سرطان سینه و سرطان پروستات نیز بیان می‌شود و در متاستاز این تومورها به بافت استخوان نقش دارد (۱۰، ۱۱).

مولکول RANKL پروتئین هموترایمیریک و عضوی جدیدی از سوپر فامیلی TNF-Family of Ligand می‌باشد (۱۲-۱۰).

ژن RANKL در انسان روی کروموزوم 14q13 واقع گردیده است و شامل ۵ آگزون می‌باشد. پروتئین آن از ۳۱۷ اسید آمینه تشکیل شده است. بیان ژن RANKL به صورت Alternative Splicing می‌باشد.

RANKL توسط غدد لنفاوی محیطی، استخوان، تیموس پلاک‌های پی‌یر، مغز، قلب، پوست، کلیه، عضلات اسلکتی، ریه و کبد به میزان زیاد بیان می‌شود. سلول‌های B و T فعال شده، استئوبلاست، استرومال، سینوویال، فیبروبلاست، اندوتلیال و کندروسیت این پروتئین را ترشح می‌کنند؛ این پروتئین دارای نقش‌های متعددی در استئوکلاستوژنیز می‌باشد به شرح زیر است:

اتصال و فیوژن پیش‌سازهای استئوکلاست‌ها به یکدیگر تشکیل سلول‌های چند هسته‌ای، تمایز پیش‌سازهای استئوکلاست به استئوکلاست بالغ، اتصال و چسبیدن استئوکلاست‌ها به سطوح استخوان، فعال کردن استئوکلاست‌ها به منظور شرکت در باز جذب جلوگیری از آپوپتوزیس استئوکلاست‌ها و حفظ بقای این سلول‌ها می‌باشد (۱۲).

به دنبال فعال شدن RANK، تکثیر و بقای استئوکلاست‌ها افزایش می‌یابد، از طرفی اتصال استئوکلاست‌ها به یکدیگر و فعال شدن آنها روی می‌دهد که در نهایت منجر به افزایش تعداد و افزایش فعالیت این سلول‌ها می‌شود (۱۲). به دنبال فعال شدن RANK این مولکول از طریق دومن‌های Cysteine-Rich TNFR like به دومن Receptor Binding مولکول RANKL متصل می‌شود. این واکنش‌ها منجر به الیگومریزاسیون RANK و متعاقب آن فعال شدن انواع متفاوتی از مسیرهای انتقال سیگنال می‌گردد و در نهایت بسیاری از ژن‌های اختصاصی استئوکلاست‌ها مانند کاتپسین K، گیرنده کلسی‌تونین، اینتگرین OSCAR، β3 و TRAP بیان می‌شوند (۱۲، ۱۳) (شکل ۲).

جدول ۱: مشخصات پرایمرها

Primer	Sequence (5'→3')	TM	Annealing temperature t (°C)	Cycle No.	Product Size (bp)
RANK	S:GGGAGCATGTGAAGGTGTCT	۵۹	۶۰ درجه سانتی‌گراد	۳۵	۱۹۴
	A:GCATCTGTCTGAAGCTGTCT	۵۷	۶۰ درجه سانتی‌گراد	۳۵	۱۹۴
RANKL	S:CCAAGATCTCCAACATGACT	۵۹	۵۹ درجه سانتی‌گراد	۳۵	۱۴۳
	A:TACACCATTAGTTGAAGATACT	۵۹	۵۹ درجه سانتی‌گراد	۳۵	۱۴۳

جدول ۲: برنامه واکنش RT-PCR به منظور بررسی بیان mRNA مربوط به RANK و RANKL

PCR مراحل	واکنش RANK	واکنش RANKL
دنانوره شدن اولیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۲ دقیقه	۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۲ دقیقه
دنانوره شدن	۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۴۵ ثانیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۴۵ ثانیه
اتصال پرایمرها	۶۱ درجه سانتی‌گراد: ۲ دقیقه	۵۹ درجه سانتی‌گراد: ۲ دقیقه
گسترش زنجیره	۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۲ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۲ دقیقه
تعداد سیکل	۳۵	۳۵

بیماران مبتلا به مایلوما، RANK و RANKL رادر سطح mRNA بیان می‌کنند (جدول ۳ و ۴).

جدول ۳: نتایج بررسی RT-PCR مربوط به بیماران

بیماران	PCR مراحل						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
RANKL	+	+	+	+	+	+	+
RANK	+	+	+	+	+	+	+

جدول ۴: نتایج بررسی RT-PCR مربوط به رده‌های سلولی

رده‌های سلولی	PCR مراحل			
	U-266	U-937	RPMI-8866	HELA
RANKL	+	+	+	+
RANK	+	+	-	-

بحث

مالتیپل مایلوما بدخیمی مربوط به پلاسماسل‌ها می‌باشد (۱، ۲). تخریب‌های پیش‌رونده استخوانی یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های این بیماری است.

تخریب استخوانی توسط فاکتورهای فعال‌کننده استئوکلاست (OAF) ایجاد می‌شود (۳).

این فاکتورها یا به صورت موضعی توسط پلاسماسل‌های مونوکلونال و یا توسط سلول‌های استرومال مغز استخوان تولید می‌شوند که باعث تحریک تمایز، شکل‌گیری، بقا و در نهایت افزایش فعالیت استئوکلاست‌ها و متعاقب آن افزایش تخریب استخوان و عوارض ناشی از آن می‌شوند. تعدادی از مهم‌ترین OAFs عبارتند از: IL-6، MIP-1 α ، IL-1 β گزارش شده است که بیان هیچ کدام از این فاکتورها در حدی نیست که باعث ایجاد ضایعات لیتیک استخوانی در مبتلایان به مایلوما شود. پس می‌توان نتیجه گرفت که حضور عوامل دیگری در ایجاد ضایعات مذکور موثر است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر بر اساس مجوز کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی انجام شد و فرم مربوط به رضایت‌نامه از تمامی بیماران اخذ گردید.

تمامی نمونه‌ها مربوط به بیماران مشکوک به مالتیپل مایلوما و لوسمی پلاسماسل بودند، بنابراین جهت تایید از نظر وجود سلول‌های مایلومایی نتایج به مربوط آنالیز فلوسایتومتری، گزارش‌های پاتولوژی بیویسی و مغز استخوان و بررسی لام خون محیطی و یا آسپیره تمامی بیماران به همراه گزارش مربوط به پرونده‌های پزشکی این بیماران بررسی شدند.

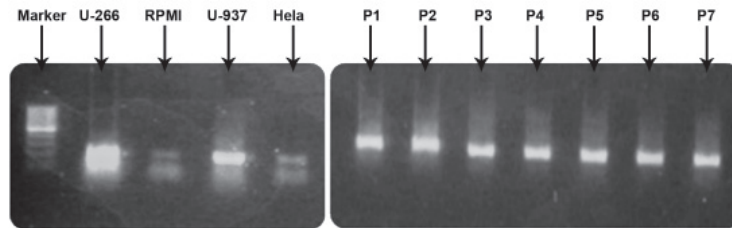
جداسازی RNA از نمونه‌های مغز استخوان و خون محیطی بیماران و رده‌های سلولی U-937، RPMI، U-266، و HeLa با استفاده از روش Guanidine thiocyanate صورت گرفت. برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده مراحل کنترل کیفی شامل تعیین غلظت RNA و خلوص آن (OD260/280) با بیوفتومتر Eppendorf انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم M-MULV صورت گرفت. برای اطمینان از کیفیت cDNA ساخته شده، واکنش زنجیره پلیمرز به منظور شناسایی یک ژن که بیان همیشگی دارد (House Keeping Gene) انجام شد. برای این منظور پرایمرهای ژن β_2 جهت ارزیابی بیان این ژن و کنترل ساخت cDNA استفاده گردید.

جهت بررسی بیان mRNA مربوط به ژن‌های RANK و RANKL در سلول‌های مایلومایی بیماران و رده‌های سلولی مورد نظر، پرایمرهای مربوط به این دو ژن طراحی شدند؛ طراحی پرایمرهای مورد نیاز با استفاده از نرم‌افزارهای OLIGO و GENERUNNER انجام شد. NCBI Blast، تایید شدند (جدول ۱ و ۲).

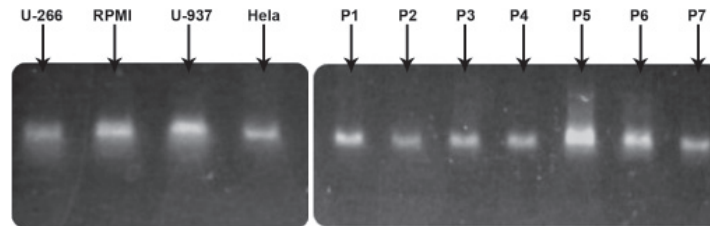
در این مطالعه جهت بررسی و مشاهده محصول PCR علاوه بر ژل پلی‌اکریل‌آمید از ژل آگارز ۱/۵ درصد نیز استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه با استفاده از تکنیک RT-PCR توانستیم نشان بدهیم که U-266 (رده سلول مایلومایی) و پلاسماسل‌های جدا شده از



شکل ۳: نتایج PCR با پرایمرهای RANK در بیماران مبتلا به مالتیپل مایلوما و لوسمی پلاسماسل بر روی ژل آگارز. بیان RANK توسط پلاسماسل‌ها به صورت باندهای مشخص با اندازه ۱۹۳ جفت باز در ژل آگارز نشان داده شده است.



شکل ۴: نتایج PCR با پرایمرهای RANKL در رده سلول مایلومایی U-937، RPMI 8866، U-266 و HeLa بر روی ژل آگارز. بیان RANKL توسط رده‌های سلولی به صورت با اندازه ۱۴۳ جفت باز نشان داده شده است.

RANKL را بیان می‌کند. در مطالعه حاضر نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که رده سلول مایلومایی انسانی U-266 مولکول RANKL را در سطح mRNA بیان می‌کند (۲۳).

هم‌چنین در مطالعه حاضر نشان داده شد که پلاسماسل‌های جدا شده از نمونه بیماران مبتلا به مایلوما و رده سلول مایلومایی انسانی U-266، مولکول RANKL را در سطح mRNA بیان می‌کنند در صورتی که در بررسی که جیولیانی با استفاده از روش RT-PCR انجام داده است گزارش شده است که مولکول RANKL توسط پلاسماسل‌های بیماران مایلومایی و رده‌های سلولی مایلوما بیان نمی‌شود (۲۴).

در مطالعه‌ای که توسط حیدر و همکاران با استفاده از روش فلوسایتومتری و به کارگیری از آنتی علیه مولکول RANKL انجام گردید، گزارش شد که پلاسماسل‌های جدا شده از خون محیطی یا RANKL را بیان نمی‌کنند و یا RANKL بیان بسیاری ضعیفی در سطح این سلول‌ها دارد. در حالی که در این مطالعه توانستیم نشان دهیم که مولکول RANKL در سطح mRNA و به طور مشخص توسط پلاسماسل‌های جدا شده از خون محیطی بیماران مبتلا به لوسمی پلاسماسل و نیز توسط پلاسماسل‌های جدا شده از آسییره مغز استخوان مبتلایان به مالتیپل مایلوما بیان می‌شود (۲۵).

همان‌طور که ذکر گردید تا به امروز گزارشی مبنی بر بررسی بیان مولکول RANK توسط پلاسماسل‌های مایلومایی منتشر نشده است. در این مطالعه با استفاده از روش RT-PCR توانستیم نشان دهیم که پلاسماسل‌های جدا شده از خون محیطی بیماران مبتلا به لوسمی پلاسماسل و پلاسماسل‌های جدا شده از آسییره مغز استخوان مبتلایان به مایلوما مولکول RANK را بیان می‌کنند.

هم‌چنین تا به امروز گزارشی از انجام بررسی بیان مولکول RANK توسط رده‌های سلول مایلومایی موش و انسان منتشر نگردیده است. در مطالعه حاضر با استفاده از روش RT-PCR بیان مولکول RANK توسط رده سلول مایلومایی انسانی U-266 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که U-266 علاوه بر RANKL، گیرنده خود (RANK) را نیز بیان می‌کند.

این تفاوت در یافته‌های مربوط به ارزیابی بیان RANKL می‌تواند به دلیل استفاده از روش‌هایی با حساسیت‌های متفاوت و یا در استفاده از پرایمرهای

سیستم Osteo Protegerin (OPG)/RANK/RANKL و نسبت بیان RANKL به OPG (RANKL: OPG) نقش مهمی در تنظیم پروسه نوسازی استخوان و حفظ تعادل میان فعالیت استئوکلاست‌ها و استئوبلاست‌ها دارد (۲۲). RANK عضوی از سوپرفامیلی TNF می‌باشد، توسط پیش‌ساز استئوکلاست و استئوبلاست بالغ بیان می‌شود و به عنوان گیرنده RANKL می‌باشد. RANKL عضوی از سوپرفامیلی TNF می‌باشد که دارای دو نوع ایزوفرم: نوع محلول و نوع متصل به غشاست. RANKL از طریق اتصال به RANK (به عنوان گیرنده) باعث فعال شدن تعدادی از مسیرهای انتقال پیام (JNK، NFκB و غیره) درون پیش‌سازهای استئوکلاست شده و در نهایت باعث تمایز، بلوغ و شکل‌گیری استئوکلاست‌ها می‌شود.

OPG نیز عضوی از سوپرفامیلی TNF می‌باشد و به عنوان گیرنده مهارتی (Decoy Receptor) برای RANKL عمل می‌کند به این صورت که از اتصال RANKL به RANK ممانعت کرده و در نهایت باعث ممانعت از تمایز، شکل‌گیری و فعالیت استئوکلاست‌ها می‌شود. فرض بر این است که RANKL عامل اصلی ایجاد بیماری استخوانی و عوارض ناشی از آن در بیماران مبتلا به مایلوما می‌باشد.

مطالعات متعددی نشان داده است که عدم تعادل بین بیان RANKL: OPG باعث ایجاد اختلالات خوش‌خیم و بدخیم استخوانی در انسان می‌شوند. با توجه به تجربیات حاصل از مطالعه حاضر و گزارش‌های متعدد منتشر شده به عوامل زیر می‌توان اشاره کرد:

– در مطالعه حاضر بیان RANK و RANKL در سطح mRNA توسط پلاسماسل‌های جدا شده از خون محیطی بیماران مبتلا به لوسمی پلاسماسل و آسییره مغز استخوان مبتلایان به مایلوما مورد ارزیابی قرار گرفتند در حالی که تا به امروز گزارشی از بررسی هم‌زمان بیان RANK و RANKL توسط سلول مایلومایی و رده سلول مایلومایی منتشر نگردیده است.

– در مورد ارزیابی بیان RANKL توسط رده‌های سلول مایلومایی، کروش و همکاران گزارش کرده‌اند که 5T2MM (رده سلول مایلومایی موش) RANKL را بیان می‌کند (۲۲). هم‌چنین سزار و همکاران با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی و نیز هیدر و همکاران با استفاده از روش فلوسایتومتری گزارش کرده‌اند که رده سلول مایلومایی انسان

در آنها یافته شایعی است، زیرا در این بررسی با استفاده از روش RT-PCR بیان RANK و بیان RANKL، در رده سلول مایلومایی و نیز پلاسماسل های جدا شده از نمونه بیماران مایلومایی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

نتیجه گیری

در مجموع، یافته‌های ما دلالت می‌کند بر اینکه در بیماران مبتلا به مایلوما پلاسماسل های مونوکلونال می‌توانند از طریق احتمالاتی که در ذیل به آنها اشاره شده است، باعث عدم تنظیم پروسه Bone-remodeling و متعاقب آن افزایش فعالیت استئو کلاست‌ها و افزایش تخریب استخوان بشوند:

- تولید و ترشح RANKL توسط پلاسماسل ها
- تولید RANK توسط پلاسماسل ها
- افزایش فعالیت مسیر انتقال پیام RANK/RANKL در استئو کلاست
- افزایش فعالیت مسیر انتقال پیام RANK/RANKL در سلول مایلومایی
- کاهش بیان OPG در بیماران مایلومایی

تقدیر و تشکر

هزینه‌های مربوط به این طرح تحقیقاتی توسط معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس پرداخت شد. لذا از همکاری این مرکز تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Engelhardt M, Mertelsmann R. 160 years of Multiple Myeloma: progress and challenges. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 1507-1509.
2. Lin P. Plasma cell neoplasms. *Diagnostic Histopathology*. 2009; 15: 134-141.
3. Edwards CM, Zhuang J, Mundy GR. The Pathogenesis of the bone disease of Multiple Myeloma. *Bone*. 2008; 42: 1007-1013.
4. Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18(3): 265-270.
5. Esteve FR, Roodman GD. Pathophysiology of myeloma bone disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007; 20: 613-624.
6. Ashcroft AJ, Davies FE, Morgan GJ. Aetiology of bone disease and the role of biphosphonate in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2003; 4: 284-292.
7. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007; 40: 251-264.
8. Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 473: 147-160.
9. Jakob C, Sterz J, Zavreski I, Heider U, Kleeberg L, Fleissner C, et al. Angiogenesis in multiple myeloma. *Eur J cancer*. 2006; 42: 1581-1590.
10. van Marion AMW, Lokhorst HM, van den Tweel JG. Pathology of Multiple Myeloma. *Current Diagnostic Pathology*. 2003; 9: 322-327.
11. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/ RANK/ OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 473: 139-146.
12. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK /RANKL : involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine and Growth factor Rev*. 2004; 15: 457-475.
13. Armstrong AP, Tometsko ME, Glaccum M, Sutherland CL, Cosman D, Dougall WC. A RANK/ TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol*

گوناگون باشد. به عنوان مثال در ارزیابی با روش ایمونوهیستوشیمی، دکلسیفیه کردن بافت می‌تواند باعث کاهش قدرت آنتی ژنیسته مولکول RANKL شود. این نکته که آیا سلول مایلومایی می‌تواند به صورت مستقیم در تنظیم مقادیر RANKL و OPG مغز استخوان و متعاقب آن عدم تنظیم پروسه نوسازی و تخریب استخوان نقش داشته باشد، همیشه به صورت یک موضوع بحث برانگیز مطرح بوده است.

در مطالعه حاضر با استفاده از روش RT-PCR به ارزیابی بیان مولکول های RANK و RANKL توسط رده سلول مایلومایی U-266 و پلاسماسل های جدا شده از آسپیره و خون محیطی مبتلایان به مایلوما و لوسمی پلاسماسل پرداخته شد. در این مطالعه نشان داده شد که رده سلول مایلومایی U-266 و پلاسماسل های جدا شده از نمونه بیماران مولکول RANK را سطح mRNA بیان می‌کنند. علاوه بر این با استفاده از روش RT-PCR و طراحی پرایمرهای RANKL به صورتی که قادر به شناسایی هر دو نوع ایزوفرم RANKL باشند، بیان این مولکول مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که رده سلول مایلومایی U-266 و پلاسماسل های جدا شده از نمونه بیماران مایلومایی مولکول RANKL را نیز بیان می‌کنند.

در کل، نتایج حاصل از این بررسی می‌تواند یافته بسیار ارزشمندی در فهم دقیق تر پاتوژنیز بیماری استخوان و ضایعات لیتیک استخوان در مبتلایان به مایلوما و احتمالاً بدخیمی های دیگری باشد که درگیری استخوان

- Chem. 2002; 277: 44347-44356.
14. Anandarajah AP. Role of RANKL in bone diseases. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20(2): 88-94.
15. Fouque-Aubert A, Chapurlat R. Influence of RANKL inhibition on immune diseases in the treatment of bone diseases. *Joint Bone Spine*. 2008; 75: 5-10.
16. Silvestris F, Lombardi L, De Matteo M, Bruno A, Dammaco F. Myeloma bone disease: pathogenetic mechanisms and clinical assessment. *Leuk Res*. 2007; 31: 129-138.
17. Seidl S, Kaufmann H, Drach J. New insights into the Pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2003; 4: 557-564.
18. Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr opin pharmacol*. 2005; 5: 618-625.
19. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine Reviews*. 2008; 29(2): 155-192.
20. Soysa NS, Alles N. NF- κ B functions in osteoclasts. *Biochem Biophys Res commun*. 2009; 378: 1-5.
21. Bommert K, Bargou RC, Stühmer T. Signaling and survival pathway in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 1574-1580.
22. De Leenheer E, Mueller GS, Vanderkerken K, Croucher PI. Evidence of a role for RANKL in the development of myeloma bone disease. *Curr opin in pharmacol*. 2004; 4: 340-346.
23. Sezer O, Heider V, Jakob C, Eucker J, Possinger K. Human bone marrow myeloma cells express RANKL. *J Clin Oncol*. 2002; 20(1): 353-354.
24. Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barille S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin / osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. 2001; 98: 3527-3533.
25. Heider U, Langelotz C, Jakob C, Zavrski L, Fleissner C, Eucker J, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor-KB ligand on bone marrow plasma cells correlates with multiple myeloma. *Clinical cancer Res*. 2003; 9: 1436-1440.