



Semnan University of Medical Sciences

# KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

**Volume 21, Issue 1 (Winter 2019), 1-204**

**ISSN: 1608-7046**

**Full text of all articles indexed in:**

*Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase*

---

## ارتباط بین غلظت سرمی RANKL با استئوپورزی در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی ماژور

فاطمه جعفری<sup>۱</sup> (M.Sc.)، آریتا آذرکیوان<sup>۲</sup> (M.D.)، داود بشاش<sup>۱</sup> (Ph.D.)، علی اکبر خادم معبودی<sup>۳</sup> (Ph.D.)، محسن حمیدپور<sup>۴\*</sup> (Ph.D.)

۱- گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه خون‌شناسی، موسسه آموزشی عالی انتقال خون، تهران، ایران

۳- گروه آمار حیاتی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی و مرکز تحقیقات سلولهای بنیادی خونساز، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۴

mohsenhp@sbmu.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۲۷۱۷۵۰۴

### چکیده

هدف: پوکی استخوان یکی از مهم‌ترین عوارض دیررس در بیماران تالاسمیک می‌باشد. افزایش فعالیت استئوکلاست‌ها، که غلظت سرمی RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) را افزایش می‌دهند، می‌تواند نقش مهمی در ایجاد استئوپوروز در این بیماران داشته باشد. هدف این مطالعه بررسی ارتباط بین غلظت سرمی RANKL با استئوپورزی در بیماران بتا تالاسمی ماژور بود.

مواد و روش‌ها: ۵۲ فرد (زن و مرد) مبتلا به بتا تالاسمی ماژور که پس از تعیین میزان سختی استخوان آن‌ها با روش DEXA، استئوپورزی بودن آن‌ها محرز شد، به عنوان بیمار و ۲۲ فرد تالاسمی مینور که فاقد پوکی استخوان بودند، به عنوان کنترل انتخاب شدند. ۶ میلی‌لیتر خون وریدی برای انجام آزمایش هماتولوژیک و اندازه‌گیری غلظت سرمی RANKL گرفته شد. یافته‌ها: میانگین تراکم استخوان بیماران به ترتیب برای استخوان‌های فمور ۰/۵۷±۰/۳ و مهره‌ها ۰/۶۹±۰/۱۱ بود. پارامترهای هماتولوژیک در بیماران کاهش معناداری نسبت به افراد کنترل نشان دادند. میزان RANKL در بیماران ۱۹۸/۴ pg/ml و در افراد کنترل ۱۱۲/۳۵ pg/ml بود که رابطه معنی‌داری بین کاهش میزان تراکم استخوان و افزایش میزان RANKL سرم بیماران مشاهده شد ( $P < 0.02$ ).

نتیجه‌گیری: فعالیت بیش از حد پروتئین RANKL در بیماران تالاسمیک می‌تواند منجر به پوکی استخوان می‌شود و می‌تواند به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص زودهنگام پوکی استخوان مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بتا تالاسمی ماژور، استئوپورزی، RANKL، پارامترهای هماتولوژیک

### مقدمه

داروی شلاتور آهن (دیسفرال)، درمان بیماران به خوبی مدیریت شده و طول عمر آن‌ها افزایش می‌یابد [۸،۷]. علیرغم حذف آهن از سرم و بافت‌ها توسط داروهای شلاتور، نهایتاً تراکم تدریجی آهن در بافت‌ها منجر به تخریب ارگان‌ها و غیر فعال شدن آن‌ها از جمله: قلب، کبد، غدد درون‌ریز و بافت استخوان می‌شود [۵]. پوکی استخوان؛ از بیماری‌های شایع متابولیکی می‌باشد که از ویژگی‌های آن ساختار طبیعی استخوان بهم ریخته و تراکم سختی استخوان کاهش می‌یابد که در بیماران تالاسمیک ماژور هم مشاهده می‌شود [۱۰،۹]. بیماران تالاسمی حتی با وجود این‌که در درمان به خوبی مدیریت شده‌اند، بین ۴۰ تا ۵۰٪ آن‌ها از پوکی استخوان رنج

بتا تالاسمی یک نوع اختلال مادرزادی خونی است که ناشی از جهش‌های متفاوت بر روی ژن زنجیره گلوبین بتا می‌باشد [۱]. تاکنون بیش از ۷۰۰ جهش شناخته شده در ناحیه بیان ژن بتا گلوبین روی کروموزوم شماره ۱۱ گزارش شده، که با الگوی اتوزومی مغلوب به ارث می‌رسد [۲-۴]. بیماران تالاسمی بتا بر اساس تظاهرات بالینی به چهار گروه مینیمال، مینور، اینترمیدیا و ماژور تقسیم می‌شوند که نوع ماژور شدیدترین نوع کم‌خونی در این گروه از بیماران می‌باشد [۵،۶]. علائم بالینی و آزمایشگاهی بیماران با افزایش طول عمر بیمار بیش‌تر و آشکارتر می‌شود که با تزریق منظم خون و تجویز

مورد شیوه آزمایش اطلاع‌رسانی آگاهانه شد و رضایت‌نامه‌ای مبنی بر موافقت با انجام آزمایش دریافت گردید. میزان تراکم استخوان (BMD (Bone Mineral Density) آزمایش تراکم استخوان بیماران در مرکز سنجش تراکم استخوان طرف قرارداد مرکز تالاسمی با روش [Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA)] در ناحیه فمور استخوان ران و مهره‌های کمر انجام گرفت.

نمونه‌گیری. ۲ میلی‌لیتر خون ضد انعقاد برای انجام آزمایش CBC و ۴ میلی‌لیتر برای تعیین میزان RANKL از بیمارانی که دچار یوکی استخوان بودند و افراد کنترل نمونه‌گیری شد. سرم هر یک از نمونه‌ها جدا و تا زمان انجام آزمایش RANKL در دمای  $8^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد.

روش اندازه‌گیری پارامترهای هماتولوژی. آزمایش CBC با استفاده از دستگاه شمارش‌گر سلولی SYSMEX-K 800 انجام گرفت و نتایج در جداول مربوطه وارد شد.

روش اندازه‌گیری پروتئین RANKL. اندازه‌گیری پروتئین RANKL با استفاده از کیت Human Soluble Receptor Activator of Nuclear factor-kB Ligand (Srankl) ELISA Kit (از شرکت (Abbexa -UK) انجام شد. به‌طور خلاصه: رقت‌هایی از استاندارد RANKL به ترتیب با غلظت‌های  $1\text{ pg/mL}$ ،  $25\text{ pg/mL}$ ،  $50\text{ pg/mL}$ ،  $125\text{ pg/mL}$ ،  $250\text{ pg/mL}$ ،  $500\text{ pg/mL}$ ،  $1000\text{ pg/mL}$  و  $2000\text{ pg/mL}$  آماده گردید سپس  $100\text{ pg/mL}$  میکرولیتر از غلظت‌های استاندارد و نمونه‌های بیماران و کنترل‌ها در چاهک‌های پلیت الیزا ریخته شد.  $90$  دقیقه در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  درجه قرار داده و  $100$  میکرولیتر از آنتی RANKL آنتی‌بادی در همه چاهک‌ها ریخته و باز در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه به مدت  $60$  دقیقه گذاشته شد. سه بار با بافر شستشو چاهک‌ها را شسته و  $100$  میکرولیتر از آنتی‌بادی ثانویه کنزوگه شده با HRP داخل چاهک‌ها ریخته و در  $37^{\circ}\text{C}$  درجه به مدت  $30$  دقیقه انکوبه گردید. سپس با بافر  $5$  بار شستشو و با اضافه کردن  $90$  میکرولیتر سوبسترا TMB به مدت  $15$  دقیقه در محل تاریک قرار داده شد. سپس  $50$  لانداز محلول NaOH به چاهک‌ها اضافه کرده تا واکنش متوقف شده و میزان جذب را در محدوده  $450$  نانومتر با دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

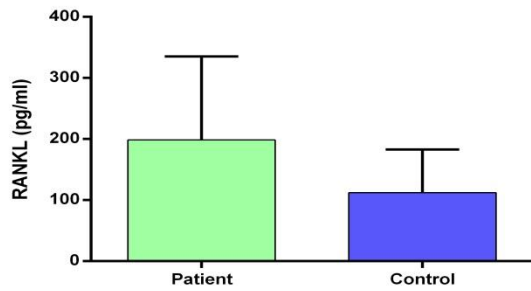
تجزیه و تحلیل آماری نتایج. اندکس‌های هماتولوژیک MCV، MCH، Hb، Hct، RBC و پروتئین RANKL وارد جداول مربوطه گردید و سپس نتایج آزمایشات به وسیله نرم‌افزار SPSS 22 تجزیه و تحلیل شدند. میانگین نتایج حاصله از آزمایش‌های بین دو گروه بیمار و کنترل با استفاده از T-test آنالیز شد، سطح معناداری آزمون  $5\%$  در نظر گرفته شد.

می‌برند [۱۱، ۱۲]. فاکتورهای مختلفی در بروز کاهش تراکم استخوان در بیماران بتا تالاسمی ماژور نقش دارند. تاخیر بلوغ جنسی، کاهش هورمون رشد، اختلال عملکرد غدد پاراتیروئید و هماتوپوئیز غیر موثر، مسمومیت استئوبلاست با آهن و فاکتورهایی که باعث به هم خوردن تعادل بین استئوبلاست و استئوکلاست شده موجب استئوپورزیس در این بیماران می‌گردد [۱۳-۱۶]. مولکول‌های سلول استرومال مغز استخوان نقش مهمی در بازسازی استخوان از طریق اتصال به سیتوکین‌های متفاوت و هورمون‌های کلسیمی ایفا می‌کنند، از اعضای خانواده بزرگ گیرنده‌های فاکتورهای نکروزدهنده تومور TNF، که در ساختن استخوان نقش اساسی دارند kB Ligand of Nuclear factor Receptor Activator (RANKL) و Osteoprotegerin (OPG) می‌باشند [۱۷] که توسط گیرنده‌های فعال‌کننده (RANK) NF-Kb و لیگندهایشان فعال می‌گردند. متصل شدن RANKL به گیرنده‌هایش بر سطح سلول‌های پیش‌ساز استخوانی موجب بروز سیگنال‌هایی شده که نهایتاً منجر به تولید استئوکلاست از سلول‌های پیش‌ساز خونی خود می‌گردد [۱۸]. به‌هر حال، تعامل بین لیگاند NF-KB (RANKL) و رسپتور آن RANK برای بلوغ و تمایز استئوکلاست‌ها و نهایتاً تکامل استخوان ضروری است، که در بیماران تالاسمی احتمالاً این مکانیسم دچار اختلال می‌گردد. به دلیل مسمومیت استئوبلاست‌ها ناشی از گرانباری آهن در بیماران تالاسمیک که موجب افزایش میزان RANKL و کاهش OPG می‌گردند، در نتیجه روند استخوان‌سازی کاهش یافته و باعث افزایش پوکی استخوان می‌شوند [۱۹، ۲۰]. با توجه به هماتوپوئیز غیر موثر و تغییرات احتمالی RANKL در این بیماران؛ تحقیق حاضر، میزان پارامترهای هماتولوژیک و پروتئین RANKL و ارتباط آن با میزان پوکی استخوان در بیماران بتا تالاسمی ماژور را در دست بررسی قرار داده است.

## مواد و روش‌ها

روش مطالعه به صورت مقطعی، مقایسه‌ای بین دو گروه بیمار بتا تالاسمی ماژور و گروه کنترل انجام شد. در این بررسی  $52$  بیمار مبتلا به بتا تالاسمی ماژور مراجعه‌کننده به درمانگاه تالاسمی ظفر که دچار پوکی استخوان بودند و  $23$  فرد با شاخصه تالاسمی مینور که فاقد استئوپورزیس بودند به عنوان نمونه‌های کنترل انتخاب شدند. قبل از شروع نمونه‌گیری اجازه کار و کد اخلاق پزشکی از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با شماره IR.SBMU. REETCH.REC.1395.104 دریافت شد. به بیماران در

که بیش تر از ۱ می باشند [۱۹]. در جدول ۱ تراکم استخوان در بیماران و افراد کنترل منعکس شده است.



شکل ۲. مقایسه میزان RANKL در دو گروه بیمار و کنترل، همان طور که ملاحظه می شود مقدار پروتئین در بیماران تا نزدیک به دو برابر نسبت افراد کنترل افزایش داشت ( $P < 0.05$ ), که می تواند نشان دهنده تغییر عملکرد در سیستم RANK/RANKL/OPG بیماران تلامیک باشد

جدول ۱. میزان تراکم استخوان بر اساس Z score و BMD در بیماران و افراد کنترل

Category	Z score		BMD	
	Femoral	Vertebra	Femoral	Vertebra
Normal	۱.۵	۱.۵	۱	۱
patients	-۲/۲±۰/۹۴	-۲/۷۶±۰/۰۹	۰/۵۷±۰/۰۳	۰/۶۹±۰/۰۱۱

تعیین میزان پوکی استخوان بیماران بر اساس Z score و الگوی WHO [۱۹] تعیین گردید، در این راستا ۱۴ نفر از بیماران دچار استئوپنی و ۳۸ نفر دچار استئوپوروز بودند. جدول ۲ میزان پوکی استخوان بیماران و طبقه بندی Z مشاهده می شود.

جدول ۲. میزان پوکی استخوان بر اساس Z score و الگوی WHO

Category	Bone mineral density (BMD)	Z score	No of sample	
			Patients	Controls
Normal	1 SD below average peak BMD of young adult	>1	0	23
Osteopenia	.0-2.5 SD below average peak BMD	-1 to -2.5	14	0
Osteoporosis	2.5 SD below the mean BMD of young adult	≤ -2.5	38	0

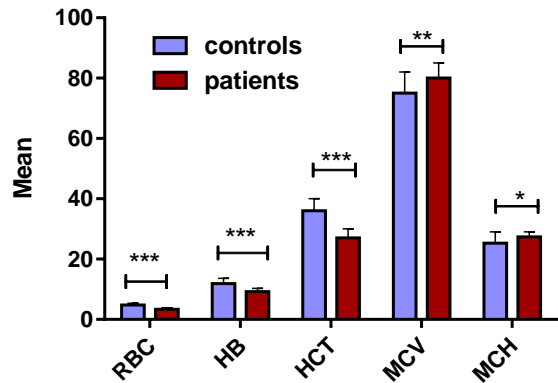
ارتباط پارامترهای هماتولوژی با تراکم استخوان. بر اساس پارامترهای تعیین شده ی RBC, Hb, Hct, MCV و MCH در گروه بیماران و مقایسه میزان میانگین این پارامترها با میانگین Z-score در دو استخوان فمور (ران) و مهره های کمر و با توجه به  $P < 0.05$  تعیین شده برای این پارامترها مشخص شد که بین میزان این فاکتورها با شاخص پوکی استخوان (Zscore) در بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور تحت مطالعه ما ارتباط معناداری وجود ندارد (جدول ۳).

رابطه پروتئین RANKL با تراکم استخوانی. بر اساس پارامتر تعیین شده و میزان ارتباط بین میانگین میزان RANKL

## نتایج

مشخصات بیماران. از ۵۲ بیمار با میانگین سنی ۳۵/۶±۷/۷ سال، ۳۱ نفر زن و ۲۱ نفر مرد بودند و میان ۲۳ فرد تالاسمی مینور با میانگین سنی ۳۱/۳±۲۰/۸ سال به عنوان کنترل؛ ۱۵ نفر زن و ۸ نفر مرد بودند.

میزان پارامترهای هماتولوژیک. میزبان پارامترهای RBC, Hb و Hct در دو گروه بیمار و کنترل نشان داد که در افراد کنترل (تالاسمی مینور) نسبت به بیماران با  $P < 0.01$  بیش تر بودند. در حالی که میزان پارامترهای MCV و MCH بیماران کمی بالاتر از افراد کنترل بود ( $P < 0.05$ ). نتایج حاصله از میانگین پارامترهای هماتولوژی RBC, Hb, Hct, MCV و MCH در دو گروه بیمار و کنترل نشان می دهد که اختلاف معناداری بین میزان این پارامترها در دو گروه وجود دارد. (شکل ۱)



شکل ۱. مقایسه میزان پارامترهای هماتولوژی در دو گروه بیمار و کنترل بر اساس P value: \* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , \*\*\* $< 0.001$  همان طور که ملاحظه می شود غیر از MCV و به مقدار کمتر MCH میانگین پارامترهای دیگر بیماران نسبت به افراد کنترل افزایش معناداری دارد.

میزان RANKL نمونه ها. برای بررسی میزان RANKL سرم بیماران و افراد کنترل از روش الیزا استفاده گردید، با استفاده از منحنی استاندارد میزان RANKL بر روی همه نمونه ها انجام گرفت، که میانگین آن برای بیماران ۱۳۶/۹±۱۹۸/۴ mL/pg و در افراد کنترل ۱۱۲/۳±۷۰/۶ mL/pg بود. همان طور که در شکل ۲ نشان داده می شود میزان RANKL سرم بیماران به طور معناداری نسبت به کنترل افزایش یافته است  $P < 0.05$ .

سنجش تراکم استخوان بیماران. با بررسی نتایج سنجش مغز استخوان بیماران، میانگین تراکم استخوان بیماران به ترتیب برای استخوان فمور ۰/۵۷±۰/۰۳ و برای استخوان مهره ها ۰/۶۹±۰/۰۱۱ بود. در مقایسه با تراکم افراد سالم جامعه

و پوکی استخوان در بیماران تالاسمی ماژور با میانگین Z score-femur در این بیماران تفاوت معنادار وجود داشت  $P=0/038$  بدین معنی که هر چقدر میزان پروتئین RANKL بیماران بالا بود میزان Z score استخوان فمور بیش تر بود و به عبارتی پوکی استخوان افزون تر بود.

جدول ۳. میزان ارتباط پارامترهای هماتولوژی با تراکم استخوان

RBC parameters	P value	
	Z score-femur	Z score-vertebra
RBC	۰/۸۴۳	۰/۹۵۶
Hb	۰/۱۵۵	۰/۱۵۸
Hct	۰/۰۹۵	۰/۳۶۲
MCV	۰/۰۷۰	۰/۶۴۰
MCH	۰/۱۳۰	۰/۲۳۳

همبستگی بین میزان بیان RANKL و Hb در گروه بیماران. با استفاده از آزمون تعیین همبستگی اسپیرمن برای تعیین همبستگی بین میزان Hb و RANKL در گروه بیماران مشاهده شد بدین معنا که هر چقدر میزان هموگلوبین کاهش یافته بود ارتباطی هر چند اندک با افزایش میزان پروتئین RANKL بود.

### بحث و نتیجه گیری

بتاتالاسمی از جمله شایع ترین بیماری های ارثی خونی مرتبط به نقص زنجیره بتاگلوبین می باشد. گزارشات به دست آمده از کشورهای مختلف نشان می دهد که میزان بروز این بیماری در برخی جوامع تا حدود ۱۰٪ می رسد [۲۱]. در بین کشورهای خاورمیانه، ایران دارای بیشترین جمعیت بتاتالاسمی بوده و بیشترین میزان شیوع بتاتالاسمی در اطراف دریای خزر و خلیج فارس گزارش شده است [۲]. تغییرات هماتولوژیک در این بیماران در ابتدای بروز بیماری مشاهده می شود که این امر با توجه به نیاز بیمار به گلبول قرمز و پاسخ بدن به این نیاز، مغز استخوان دچار هیپرپلازی می گردد و به دنبال آن پوکی استخوان در این بیماران بروز می کند. در این مطالعه، نتایج آزمایش های هماتولوژی نشان داد که پارامترهای گلبول قرمز بیماران با اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل غیر طبیعی بودند. افزایش میزان MCV بیماران بر خلاف دیگر پارامترهای می تواند ناشی از: ۱- تزریق خون، ۲- تارگت شکل بودن گلبول های قرمز افراد تالاسمی ماژور، ۳- وجود رتیکولیسیت های فراوان؛ موجب افزایش این پارامتر و حتی به مقدار کمی MCH می شوند [۳]. از طرفی میزان هموگلوبین در بیماران مورد مطالعه با میزان RANKL سرم آنها به طور معکوس ارتباط داشت، این می تواند ناشی از خون سازی زیاد و افزایش فضای مغز استخوان باشد ولی به

دلیل غیر موثر بودن خون سازی و تخریب زود هنگام گلبول های قرمز میزان هموگلوبین شدیداً پایین بوده، در عوض با تخریب بافت استخوان میزان RANKL سرم افزایش یافته و به دنبال آن پوکی استخوان در بیمار مشاهده می گردد. مطالعات دیگران هم حاکی از افزایش میزان RANKL در افراد تالاسمی و ارتباط آن با میزان هموگلوبین همبستگی منفی دارد [۲۳، ۲۲]. در این مطالعه میانگین میزان RANKL در بیمار تالاسمی ماژور  $136/9 \pm 198/4$  پیکوگرم در میلی لیتر بود که نسبت به افراد کنترل ( $112/3 \pm 70/6$ ) به طور معناداری افزایش داشت. طبق یافته هایی که در این مطالعه به دست آمد متوجه شدیم میزان RANKL در زنان بیش تر از مردان و هم چنین با افزایش سن میزان پروتئین RANKL نیز افزایش داشت. در مطالعه ای که توسط Hosam Salah و همکاران انجام شد، افزایش میزان پروتئین RANKL به میزان  $78 \text{ pg/ml}$  در بیماران تالاسمی ماژور گزارش گردید که در مقایسه با جمعیت کنترل افزایش قابل اعتنایی داشت [۲۴]. از طرفی Nicholas و همکارانش ادعا کردند که؛ میزان RANKL با فاکتورهای سن، جنس، در ارتباط است به نحوی که با افزایش سن، میزان RANKL افزایش یافته بود [۲۵]. میزان BMD استخوان فمور و مهره های بیماران به ترتیب  $0/3 \pm 0/57$  و  $0/11 \pm 0/69$  بود که با الگوی بهداشت جهانی کم تر از ۱ نشانه پوکی استخوان بیماران می باشد [۱۹]. در مطالعه حاضر رابطه معکوس معناداری بین میزان BMD ( $z\text{-score} < -1$ ) استخوان فمور و میزان RANKL مشاهده شد ( $P < 0/02$ ). لازم به یادآوری است که معیار z-score روش استاندارد برای محاسبه سنجش سختی استخوان در نوجوانان و خردسالان می باشد [۲۶].

ارتباط BMD با پارامترهای هماتولوژیک به چند دلیل می تواند باشد: ۱- خون سازی غیر موثر که موجب افزایش فضای مغز استخوان بیماران تالاسمی شده، در نتیجه ضخامت اسخوانها به خصوص استخوان های پهن کاهش یافته و حتی منجر به تغییر شکل استخوانها می شود [۲۷]؛ ۲- به علت ترانسفیوژن مکرر خون، گرانباری آهن در غدد درون ریز به ویژه پاراتیروئید و بافت استخوان به وجود آمده [۲۸] و باعث تخریب غدد و سلول های استخوان ساز می شود. این تخریب می تواند ناشی از مسمومیت با رادیکال های آزاد ناشی از آهن باشد [۲۹]. از طرف دیگر ارتباط BMD و میزان RANKL در فرایند پوکی استخوان بیماران تالاسمی می تواند ناشی از تغییر در سیستم RANK/RANKL/OPG که آنهم از طریق مکانیزم های پیچیده ای از جمله آنمی های مزمن، مسمومیت با آهن و اختلالات غدد درون ریز باشد [۳۰]. لازم به یادآوری است که، RANKL و OPG، از مهم ترین تنظیم کننده های



- [12] Rossi F, Perrotta S, Bellini G, Luongo L, Tortora C, Siniscalco D, et al. Iron overload causes osteoporosis in thalassemia major patients through interaction with transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels. *Haematologica* 2014; 99: 1876-1884.
- [13] Voskaridou E, Terpos E. New insights into the pathophysiology and management of osteoporosis in patients with beta thalassaemia. *Br J Haematol* 2004; 127: 127-139.
- [14] Skordis N, Efstathiou E, Kyriakou A, Toumba M. Hormonal dysregulation and bones in thalassaemia--an overview. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008; 6: 107-115.
- [15] Olivieri NF, Koren G, Harris J, Khattak S, Freedman MH, Templeton DM, et al. Growth failure and bony changes induced by deferoxamine. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992; 14: 48-56.
- [16] Toumba M, Skordis N. Osteoporosis syndrome in thalassaemia major: an overview. *J Osteoporos* 2010; 2010: 1-8.
- [17] Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 549-553.
- [18] Saki N, Abroun S, Salari F, Fakher R, Shahjehani M, Mohammadi-Asl J. Molecular aspects of bone resorption in  $\beta$ -thalassaemia major. *Cell J (Yakhteh)* 2015; 17: 193-199. (Persian).
- [19] Jensen CE, Tuck SM, Agnew JE, Koneru S, Morris RW, Yardumian A, Prescott E, Hoffbrand AV, Wonke B. High prevalence of low bone mass in thalassaemia major. *Br J Haematol* 1998; 103: 911-915.
- [20] Ilich JZ, Kerstetter JE. Kerstetter, Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. *J Am Coll Nutr* 2000; 19: 715-737.
- [21] WHO study group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series 843, 1994. Geneva. <http://www.who.int/iris/handle/10665/39142>
- [22] Morabito N, Gaudio A, Lasco A, Atteritano M, Pizzoleo MA, Cincotta M, et al. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of thalassemia induced osteoporosis: new pieces of the puzzle. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 722-727.
- [23] Morabito N, Catalano A, Gaudio A, Morini E, Bruno LM, Basile G, et al. Effects of strontium ranelate on bone mass and bone turnover in women with thalassaemia major-related osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2016; 34: 540-546.
- [24] Salah H, Atfy M, Fathy A, Atfy M, Mansor H, Saeed J. The clinical significance of OPG/sRANKL ratio in thalassemia patients suffering from osteopenia or osteoporosis in egyptian patients. *Immunol Invest* 2010; 39: 820-832.
- [25] Angelopoulos NG, Goula A, Katounda E, Rombopoulos G, Kaltzidou V, Kaltsas D, et al. Circulating osteoprotegerin and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand system in patients with  $\beta$ -thalassaemia major. *J Bone Miner Metab* 2007; 25(1): 60-67
- [26] Hamidi Z, Sedaghat M, Mortaz Hejri S, Larijani B. Defining cut-off values for the diagnosis of osteoporosis in postmenopausal women by quantitative ultrasonography of the phalanx. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24: 546-554.
- [27] Wong P, Fuller PJ, Gillespie MT, Milat F. Bone disease in thalassemia: a molecular and clinical overview. *Endocr Rev* 2016; 37: 320-346.
- [28] Kwiatkowski JL. Management of transfusional iron overload - differential properties and efficacy of iron chelating agents. *J Blood Med* 2011; 2: 135-149.
- [29] Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 202: 199-211.
- [30] Khosla S. Minireview: The opg/rankl/rank system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050-5055.
- [31] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 2006; 12: 17-25.
- [32] Jeney V. Clinical impact and cellular mechanisms of iron overload-associated bone loss. *Front Pharmacol* 2017; 8: 1-11.

استئوکلستوزنز هستند و با اتصال OPG به RANKL, RANK دیگر نمی تواند به فعال کننده گیرنده فاکتور هسته های KB (RANK) که بر روی استئوکلست هستند متصل شوند [۳۲،۳۱]. پس می توان گفت OPG به عنوان یک گیرنده برای لیگاند فعال کننده گیرنده فاکتور هسته ای KB (NF-KB) (RANKL) عمل می کند.

با توجه به افزایش میزان پروتئین RANKL در سرم بیماران و ارتباط معنادار با میزان پوکی استخوان آن ها، اندازه گیری میزان RANKL بیماران تالاسمی به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص زودرس پوکی استخوان پیشنهاد می شود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مرکز بیماران تالاسمی ظفر به خاطر همکاری بدون منت و از معاونت تحقیقات دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر حمایت از انجام این طرح تشکر و قدردانی می نمایند.

### منابع

- [1] Jalali H, Mahdavi MR, Roshan P, Kosaryan M, Karami M, Mahdavi M. Alpha thalassemia gene mutations in neonates from Mazandaran, Iran, 2012. *Hematology* 2014; 19: 192-195. (Persian).
- [2] Moradi G, Ghaderi E. Chronic disease program in Iran: Thalassemia control program. *Chronic Dis J* 2013; 1: 98-106.
- [3] Galehdari H, Salehi B, Bijan Keikhaei S, Zandian KM, Pedram M. Comprehensive spectrum of the  $\beta$ -thalassaemia mutations in Khuzestan, Southwest Iran. *Hemoglobin* 2010; 34: 461-468.
- [4] Prabhu R, Prabhu V. Iron overload in beta thalassemia: a review. *J Biosci Tech* 2009; 1: 20-31.
- [5] Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 11-18.
- [6] McLaren CE, Barton JC, Adams PC, Harris EL, Acton RT, Press N, et al. Hemochromatosis and IronOverload Screening (HEIRS) study design for an evaluation of 100,000 primary care-based adults. *Am J Med Sci* 2003; 325: 53-62.
- [7] Kattamis AC, Antoniadis M, Manoli I, Kitra V, Petropoulos D, Grafakos S. Endocrine problems in ex-thalassaemic patients. *Transfus Sci* 2000; 23: 251-252.
- [8] Mohammadian S, Bazrafshan U, Sadeghi-Nejad A. Endocrine gland abnormalities in thalassemia major: a brief review. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003; 16: 957-964.
- [9] Khashayar P, Aghaei Meybodi HR, Rezaei Homami M, Heshmat R, Larijani B. The prevalence of osteoporosis in an Iranian population. *J Clin Densitometr* 2010; 13: 112-119. (Persian).
- [10] Salehi Abari I, Khazaeli S, Najafizadeh R, Malekpour M. High prevalence of low bone density in young Iranian healthy individuals. *Clin Rheumatol* 2009; 28: 173-177.
- [11] De Sanctis V, Soliman AT, Elsedfy H, Yassin M, Canatan D, Kilinc Y, et al. Osteoporosis in thalassemia major: an update and the I-CET 2013 recommendations for surveillance and treatment. *Pediatr Endocrinol Rev* 2013; 11: 167-180.

## Correlation between serum levels of RANKL with osteoporosis in patients with beta thalassemia major

Fatemeh Jafari (MS.c)<sup>1</sup>, Azita Azarkeivan (M.D)<sup>2</sup>, Davod Bashash (Ph.D)<sup>1</sup>, Ali Akbar Khadem Maboodi (Ph.D)<sup>3</sup>, Mohsen Hamidpour (Ph.D)<sup>\*4</sup>

1- Dept. of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Iranian Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO), Tehran, Iran.

3- Dept. of Biostatistics, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Dept. of Hematology and Blood Banking, Hemopoietic Stem cell Research Center (HSCRC), School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author. +98 2122717504

mohsenhp@sbmu.ac.ir

Received: 28 Apr 2018; Accepted: 5 Sep 2018

**Introduction:** Osteoporosis is a major problem in patients with B-thalassemia major. Osteoclasts hyperactivity, which increases serum levels of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), plays an important role in the pathogenesis of osteoporosis in these patients. The aim of this study was to study the relationship between serum levels of RANKL and osteoporosis in patients with beta thalassemia major.

**Materials and Methods:** 52 patients with beta thalassemia major and 22 people with thalassemia minor without any osteoporosis symptoms as controls were entered the study. Six ml of peripheral blood was obtained for hematologic and serum RANKL measurements.

**Results:** The mean of bone mineral density in patients were  $0.57 \pm 0.3$  and  $0.69 \pm 0.11$  in femur and vertebra, respectively. There were significant differences between hematologic parameters of patients and controls. The mean of patient's serum RANKL level was 198.4pg/mL and in controls was 112.25pg/mL. There was a correlation between decrease of femur BMD ( $p < 0.02$ ) and increase of RANKL level.

**Conclusion:** Our findings demonstrate that increases of serum levels of RANKL in patients with beta thalassemia major may lead to the osteoporosis, and thus, the detection of RANKL, could be useful for early diagnosis of osteoporosis.

**Keywords:** B- Thalassemia Major, Osteoporosis, Hematologic Parameters, RANKL.