

## ارتباط بین غلظت سرمی RANKL با اختلالات قلبی در بیماران بتا تالاسمی ماژور

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۱۶

### خلاصه

#### مقدمه

بتا تالاسمی ماژور نوعی اختلال اتوزومال مغلوب است که با اریتروپوئز غیر موثر شناخته می‌شود. تزریق مداوم و ناتوانی بدن در حذف آهن در بدن منجر به اضافه بار آهن شده که باعث ایجاد صدمه به بافت قلب می‌شود. یکی از مسیرهای تنظیمی بیماریهای قلبی با واسطه تجمع آهن، مسیر Osteoprotegerin/RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B / Receptor Activator of Nuclear Factor Ligand RANKL می‌باشد. گیرنده فاکتور هسته ایی کاپا<sub>۱</sub>(RANK)B و استئوپروتگرین (OPG) هستند. هدف از این مطالعه بررسی سطح سرمی RANKL و ارتباط آن با هیپرتروفی بطن چپ (LVH) و اختلال عملکرد دیاستولیک و کسر جهشی و فشار خون ریوی و شاخص \*2 MRIT در بیماران تالاسمی ماژور می‌باشد.

#### روش کار

این پژوهش در سال ۱۳۹۶ به روش توصیفی روی ۸۲ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور کلینیک سرور مشهد انجام شد. تمام بیماران، مورد بررسی کامل و غیر تهاجمی (اکوکاردیوگرافی کامل ۲ بعدی و داپلر M-Mode رنگی و \*2 MRIT) قرار گرفتند. برای اندازه گیری سطح سرمی RANKL از تکنیک الایزا استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری از spss20 استفاده شد.

#### نتایج

از مجموع ۸۲ بیمار ۳۶ زن و ۴۶ مرد بودند. میانگین سنی بیماران  $23/69 \pm 6/83$  سال بود. هایپرتروفی بطن چپ و اختلال عملکرد دیاستولیک به ترتیب در ۲۴ بیمار (۲۹/۳۰٪) و ۲۳ نفر (۲۸٪) وجود داشت. ارتباط معناداری بین سرم RANKL با هایپرتروفی بطن چپ، اختلال عملکرد دیاستولیک، کسر جهشی، فشار خون ریوی، شاخص \*2 MRIT وجود نداشت. ( $P > 0/05$ )

#### نتیجه گیری

یافته‌های پژوهشی نشان داد که بین سطح RANKL سرم با شدت درگیری قلب هایپرتروفی بطن چپ، نقص عملکرد دیاستولیک، کسر جهشی، فشار خون ریوی، شاخص \*2 MRIT ارتباط معناداری وجود ندارد که این یافته پژوهشهای بیشتری را در این مورد فرا میخواند.

#### کلمات کلیدی

بتا تالاسمی ماژور، RANKL، اکوکاردیوگرافی، \*2 MRIT

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

الهام محمودی<sup>۱</sup>

زهرا بدیعی<sup>۲</sup>

حسن متقی مقدم شهری<sup>۳</sup>

الهام پوررحیم<sup>۱</sup>

محمد هادی صادقیان<sup>۴</sup>

محمد رضا کرامتی<sup>\*۴</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

<sup>۲</sup> فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی کودکان، دانشیار گروه کودکان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

<sup>۳</sup> فوق تخصص قلب کودکان، استاد گروه کودکان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

<sup>۴</sup> متخصص باتولوژی بالینی و تشریحی، مرکز تحقیقات باتولوژی مولکولی سرطان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

Email: keramatimr@mums.ac.ir

## مقدمه

بیماری بتا تالاسمی ماژور یک اختلال ژنتیکی ناشی از جهش‌های متفاوت بر روی ژن زنجیره بتا است و منجر به کاهش شدید طول عمر گلوبول‌های قرمز می‌شود. آنمی همولیتیک شدید و پیش رونده در شش ماه دوم زندگی ایجاد می‌شود. این بیماری در آفریقا، نواحی استوایی و مدیترانه‌ای، ایران، هند و جنوب چین شیوع بیشتری دارد. شیوع اختلال ژنتیکی مربوط به تالاسمی در مناطق از ۲/۵٪ تا ۱/۵٪ و در مطالعه‌های دیگر ۳-۴ درصد گزارش شده است (۱). در سال ۲۰۱۱ در ایران، بیش از حدود ۳ میلیون نفر به تالاسمی مینور و ۲۵ هزار نفر مبتلا به تالاسمی ماژور بودند. همچنین بروز ژن بتا تالاسمی در جنوب و جنوب شرق کشور، ۸٪ گزارش شده است. تالاسمی در زنان و مردان به یک نسبت رخ می‌دهد و میزان وقوع آن ۴،۴ نفر در ۱۰۰۰ تولد زنده می‌باشد (۲).

اختلالات قلبی به عنوان علت اصلی مرگ و میر در بیش از ۵۰ درصد از بیماران تالاسمی گزارش شده است. دو ساز و کار عمده ساختار و عملکرد قلب را در بیماران تالاسمی تحت تاثیر قرار می‌دهد: انباشت آهن اضافی در درون سلول‌های قلبی و افزایش برون ده قلبی. اختلالات ناشی از مکانیسم اول موجب تاثیر میوکارد قلبی و هایپرتروفی در این لایه قلب می‌شود. عملکرد معیوب بطن چپ قلب عمدتاً ناشی از این وضعیت است. مکانیسم بروز این اختلال به حساسیت میوکارد به رادیکال آزاد اکسیژن ناشی از آهن آزاد درون سلولی بر میگردد که در ادامه به اختلال عملکرد دیاستولی منجر می‌شود (۳).

از سوی دیگر مکانیسم دوم خود ناشی از وجود مزمن و هایپوکسی ناشی از آن و واکنش بدن در افزایش سلول‌های رده‌ی اریتروئیدی می‌باشد موجب افزایش حجم خون می‌گردد. در این حالت قلب با افزایش برون ده خود این وضعیت را تعدیل میکند اما این مکانیسم در ادامه فعالیت خود منجر به فشار بیش تر به قلب به دلیل افزایش شدت و میزان انقباضات آن می‌گردد. متعاقباً این ساز و کار به افزایش مقاومت عروق ریوی و به تبع آن افزایش فشار ریوی، عفونت میوکارد و پریکارد را

می‌توان از عوامل اصلی در بروز اختلالات قلبی در بیماران تالاسمی است. این اختلالات در هر سنی بعد از ۱۰ سالگی می‌توانند موجب اختلالات قلبی در این بیماران شوند، هر چند امروزه با پیشرفت روش‌های مراقبتی و درمانی، بروز این اختلال تا دهه‌های سوم و چهارم زندگی به تاخیر می‌افتد (۳ و ۴).

علی رغم استفاده از شلاته کننده‌های آهن در بیماران بتا تالاسمی، ۵۰٪ بیماران بعد از سن ۳۵ سالگی جان خود را از دست می‌دهند.

یکی از مسیرهای تنظیمی بیماری‌های قلبی با واسطه تجمع آهن، مسیر OPG /RANK/RANKL می‌باشد. گیرنده فاکتور هسته‌ای کاپا<sub>B</sub> (RANKL) / لیگاند فعال کننده فاکتور هسته‌ای کاپا<sub>B</sub> (RANK) و استئوپروتئین (OPG) هستند. این مسیر در سیستم قلبی با افزایش تخریب و تشدید التهاب ماتریکس در گسترش نارسایی بطن شرکت کرده که در نهایت باعث نارسایی‌های مزمن قلبی می‌شود نقش دارد. این محور شامل مولکول‌های OPG، RANK و RANKL است. OPG و RANKL تنظیم کننده‌های اصلی این محور هستند. RANKL بر روی سلول‌های T قرار دارد. در حالی که RANK گیرنده RANKL است که بر سطح کاردیومیوسیت وجود دارد. اتصال RANKL به RANK قادر به تحریک فعالیت متالوپروتئیناز ماتریس (MMP) و در نتیجه تخریب ماتریکس خارج سلولی و التهاب می‌باشد که در نهایت نارسایی بطنی را در پی خواهد داشت (۷-۵).

ژن RANKL در انسان روی کروموزوم ۱۴ q13 واقع گردیده است و شامل ۵ اگزون می‌باشد. پروتئین آن از ۳۱۷ اسید آمینه تشکیل شده است. بیان ژن RANKL به صورت Splicing Alternative می‌باشد RANKL. توسط غدد لنفاوی محیطی، استخوان، تیموس پلاک‌های پیر، مغز، قلب، پوست، کلیه، عضلات اسلکتی، ریه و کبد به میزان زیاد بیان می‌شود. سلول‌های B و T فعال شده، استئوبلاست، استرومال، سینیویال، فیبروبلاست، اندوتلیال و کندروسیت این پروتئین را ترشح می‌کنند (۸).

۴۰، ۲۰ pg/ml، ۰ pg/ml، آماده گردید. سپس در چاهک بلانک فقط ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی نشان دار ریخته شد. در چاهک‌های استاندارد ۵۰ میکرولیتر از شش غلظت درج شده در جدول و ۵۰ میکرولیتر streptavidin-HRP اضافه شد. در چاهک‌های نمونه بیماران و گروه کنترل ۴۰ میکرولیتر سرم بیمار بعلاوه ۱۰ میکرولیتر RANKL آنتی بادی و ۵۰ میکرولیتر streptavidin-HRP اضافه شد. ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. سه بار با بافر شستشو چاهک‌ها را شستشو شد. ۵۰ میکرولیتر کروموژن A، ۵۰ میکرولیتر کروموژن B به هر چاهک اضافه شد. به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه در محل تاریک انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول stop به چاهک‌ها اضافه کرده تا واکنش متوقف شده و میزان جذب را در محدوده ۴۵۰ نانومتر با دستگاه ایزاریدر خوانده شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج: اطلاعات حاصل از یافته‌های اکوکاردیوگرافی و MRI\*2 و میزان پروتئین RANKL وارد جداول مربوطه گردید تمامی تحلیل‌ها در نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ در سطح معنی داری ۰/۰۵ صورت پذیرفت. قبل از انجام تحلیل‌های آماری ابتدا نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی را با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنف ارزیابی شد و از آزمون پارامتری تی مستقل برای مقایسه میانگین سطح سرم استفاده شد.

### نتایج

از ۸۲ بیمار با میانگین سنی  $23/69 \pm 6/83$ ، ۳۶ نفر زن و ۴۶ نفر مرد بودند. برای بررسی سطح سرمی RANKL با هایپرتروفی بطن چپ و اختلال عملکرد دیاستولیک بیماران به دو گروه فاقد هایپرتروفی بطن چپ و دارای هایپرتروفی بطن چپ و همچنین بیماران با نقص عملکرد دیاستولیک و بدون نقص عملکرد دیاستولیک تقسیم بندی شدند.

با توجه به نقش Rankl در تخریب ماتریکس خارج سلولی و التهاب و در نهایت نارسایی بطنی، در تحقیق حاضر میزان سطح سرمی RANKL و ارتباط آن با پارامترهای اکوکاردیوگرافی کسر جهشی، فشار خون ریوی، هایپرتروفی بطن چپ، نقص عملکرد دیاستولیک، شاخص توده بطن چپ و میزان رسوب آهن از طریق MRIT\*2 در بیماران تالاسمی ماژور در دست بررسی قرار داده است.

### روش کار

این مطالعه به صورت مقطعی در سال ۱۳۹۶ بر روی ۸۲ بیمار مبتلا به بتا تالاسمی ماژور مراجعه کننده به کلینیک سرور که دارای اکوکاردیوگرافی و MRIT\*2 بودند انجام شد. قبل از شروع نمونه گیری اجازه کار و کد اخلاق پزشکی از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد با شماره IR.MUMS.fm.REC.1396.538 دریافت شد. به بیماران در مورد شیوه آزمایش اطلاع رسانی آگاهانه شد و بصورت شفاهی رضایت نامه مبنی بر موافقت با انجام آزمایش دریافت گردید. جهت ارزیابی اختلالات عملکرد قلب به پرونده بیماران رجوع کرده و با توجه به MRI\*T2 و اکوکاردیوگرافی، وضعیت عملکرد قلب توسط متخصص قلب ارزیابی شد. همچنین پارامترهایی از قبیل: سن، جنس، BMI، سطح فریتین، فاصله زمانی بین ترنسفیوژن‌ها از پرونده بیماران استخراج شد.

نمونه گیری: ۲ میلی لیتر خون بدون ضد انعقاد برای تعیین میزان RANKL از بیماران نمونه گیری شد. سرم هر یک از نمونه‌ها جدا و تا زمان انجام آزمایش RANKL در دمای ۸۰-سانتی گراد نگهداری شد.

روش اندازه گیری پروتئین RANKL: اندازه گیری پروتئین RANKL با استفاده از کیت Human Soluble Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Zellbio Ligand (RANKL) ELISA Kit از شرکت GmbH انجام شد.

بطور خلاصه: رقت‌هایی از استاندارد RANKL به ترتیب با غلظت‌های ۰ pg/ml، ۸۰ pg/ml، ۱۶۰ pg/ml، ۳۲۰ pg/ml



**جدول ۱- توزیع فراوانی شاخص های مورد بررسی بیماران بتا تالاسمی ماژور**

متغیر	تعداد(درصد)
جنسیت	
مرد	۴۶ (۵۶/۱۰)
زن	۳۶ (۴۳/۹۰)
MRIT*2	
Normal	۳۱ (۳۷/۸۰)
Mild	۱۹ (۲۳/۲۰)
Moderate	۱۶ (۱۹/۵۰)
Severe	۱۶ (۱۹/۵۰)
هایپرتروفی بطن چپ	
-	۵۸ (۷۰/۷۰)
+	۲۴ (۲۹/۳۰)
نقص عملکرد دیاستولیک	
-	۵۹ (۷۲/۰۰)
+	۲۴ (۲۸/۰۰)
اسپلنوکتومی	
-	۴۳ (۵۲/۴۰)
+	۳۹ (۴۷/۶۰)

**جدول ۲- میانگین و انحراف معیار متغیرهای کمی تحت بررسی بیماران بتا تالاسمی ماژور**

متغیر	حداقل	حداکثر	انحراف معیار± میانگین
سن (سال)	۱۱	۴۳	۲۳,۶۹±۶,۸۳
(kg/m <sup>2</sup> ) شاخص توده بدنی	۱۳	۲۸	۲۰,۳۵±۳,۳۷
(ng/ml) سطح فریتین	۲۰۰	۳۴۰۰۰	۳۶۹۸±۵۴۵,۲۲
(RANKL pg/ml) سطح سرم	۱۴/۱۰	۱۲۱/۲۰	۵۸/۲۰±۲۳/۸۳
(LVEED) mm	۳۰	۷۰	۴۸/۹۰±۷/۳۴
(LVESD) mm	۲۱	۴۸	۳۱/۲۳±۶/۰۲
(EDV) ml	۲۶	۱۹۸	۹۷/۰۵±۳۰/۸۶
(ESV) ml	۲۰/۰۵	۹۱	۳۷/۴۷±۱۵/۱۹
EF	۳۰	۷۲	۵۶/۳۴±۷/۶۷
PAP	۲۰	۳۹	۲۷/۷۳±۴/۲۴

(حجم نمونه کمتر از ۳۰ در بعضی از گروه‌ها). لذا از آزمون ناپارامتری گروسکال-والیس برای مقایسه میانگین سطح سرم RANKL بین چهار سطح MRIT2 استفاده شد.

طبق نتایج حاصل از آزمون گروسکال-والیس، تفاوت معنی داری بین میانگین سطح سرم RANKL در چهار سطح MRIT2 از نظر آماری وجود ندارد ( $p > 0.05$ ) (جدول ۸). شایان ذکر است که توزیع داده‌ها طبق قضیه حدمرکزی نرمال نیست

### جدول ۳- مقایسه میانگین سطح سرم RANKL در سطوح مختلف MRIT2

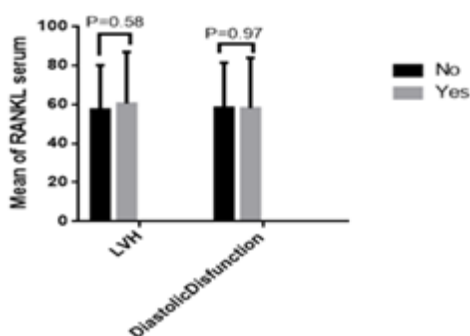
نتیجه آزمون	MRIT*2				سطح سرم RANKL
	Severe	Moderate	Mild	Normal	
= ۰/۳۰ p	۵۳/۲۶±۲۷/۶۰	۵۶/۱۶±۲۸/۷۲	۵۴/۸۶±۲۴/۷۱	۶۳/۸۵±۱۷/۸۵	

مستقل برای مقایسه میانگین سطح سرم استفاده می‌نماییم. نتایج حاصل از آزمون تی مستقل نشان داد که میانگین سطح سرم RANKL بین بیماران با و بدون LVH تفاوت معنی داری از نظر آماری ندارد ( $p > 0/05$ ). همچنین تفاوت معنی داری بین میانگین سطح سرم RANKL در بیماران با و بدون LVMI وجود ندارد ( $p > 0/05$ ). علاوه بر این میانگین سطح سرم بیماران با و بدون نقص عملکرد دیاستولیک نیز از نظر آماری اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند ( $p > 0/05$ ) (جدول ۴).

در این بخش، قبل از انجام تحلیل‌های آماری ابتدا نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی را با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی می‌نماییم که نتایج حاصل از آن در جدول ذیل آمده است. قابل ذکر است در صورتی که توزیع متغیر سطح سرم در هر دو گروه نرمال باشد، توزیع متغیر نرمال در نظر گرفته می‌شود. نتایج حاصل از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف نشان داد که توزیع متغیر سطح سرم RANKL در هر دو گروه متغیرها، نرمال است ( $p > 0/05$ ). لذا از آزمون پارامتری تی

### جدول ۴- مقایسه میانگین متغیر سطح سرم RANKL در سطوح متغیرهای اکوکاردیوگرافی

نتیجه آزمون	سطح سرم		متغیر
	انحراف معیار ± میانگین		
هایپرتروفی بطن چپ ۰/۵۸P=	۵۷/۲۷±۲۷/۸۴	-	
	۶۰/۴۴±۲۶/۴۶	+	
اختلال عملکرد دیاستولیک ۰/۹۷P=	۵۸/۲۶±۲۳/۲۳	-	
	۵۸/۰۵±۲۶/۸۶	+	



### نمودار ۱- مقایسه میانگین سطح سرم RANKL در افراد با و بدون اختلال قلبی

توزیع متغیر PAP نرمال نبود ( $p > 0/05$ ). طبق نتایج حاصل از آزمون ضریب همبستگی پیرسون ارتباط معکوسی بین متغیر

طبق آزمون کولموگروف-اسمیرنوف متغیرهای سطح سرم RANKL و EF دارای توزیع نرمال بودند ( $p > 0/05$ ). ولی

سطح سرم RANKL با متغیر EF وجود دارد یعنی افزایش (کاهش) یکی، باعث کاهش (افزایش) دیگری می‌شود. ولی این میزان ارتباط از نظر آماری معنی دار نیست ( $p > 0.05$ ). همچنین طبق نتایج حاصل از آزمون ضریب همبستگی اسپیرمن

به طور مشابه، ارتباط معکوسی بین متغیر سطح سرم RANKL با متغیر PAP وجود دارد یعنی افزایش (کاهش) یکی، باعث کاهش (افزایش) دیگری می‌شود. ولی این میزان ارتباط از نظر آماری معنی دار نیست ( $p > 0.05$ ) (جدول ۶).

جدول ۶- بررسی ارتباط بین متغیر سطح سرم RANKL با EF و PAP

متغیر	RANKL متغیر سطح سرم
EF (کسر جهشی)	r = -0.18 p = 0.09
PAP (فشار خون ریوی)	r = -0.11 p = 0.31

### بحث و نتیجه گیری

تزریق مکرر خون به دلیل آنمی شدید در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی ماژور در مقایسه با افراد عادی میزان آهن در بدن را چندین برابر افزایش می‌دهد که موجب رسوب آهن در بافت قلب شده که باعث فیروز و اختلال در عملکرد قلب شده بطوریکه مهم‌ترین علت مرگ در این بیماران محسوب می‌شود. عوامل متعددی در پاتوژنز اختلالات قلبی و کاردیومیوپاتی در تالاسمی ماژور نقش دارد از جمله افزایش برون ده قلب بر اثر آنمی ایجاد شده، مکانسیم‌های توکسیته آهن بر قلب و عفونت میوکارد قلب.

افزایش برون ده قلب ناشی از آنمی مزمن حتی در مبتلایان جوان با سطح هموگلوبین ۹ گرم بر دسی لیتر باعث ناهنجاری‌های مورفولوژیک بطن چپ نقص عملکرد سیستولیک و دیاستولیک می‌شود (۹ و ۱۰).

رسوب آهن در میوکارد بیماران تالاسمی ماژور تا مراحل پایانی بیماری اثرات مختلفی بر عملکرد دیاستولیک بطن چپ می‌گذارد، با این وجود اضافه بار شدید آهن می‌تواند منجر به افزایش ضخامت دیواره دهلیز چپ، گشاد شدن دهلیز راست و اختلال در عملکرد بطن چپ شود. علی‌رغم تزریق خون منظم و درمان با شلاته‌کننده‌های آهن نقص عملکرد سیستولیک به دلیل کاهش وضعیت انقباضی قلب را در پی خواهد داشت که می‌تواند توجیه‌کننده عوارض ثانویه به رسوب و سمیت آهن باشد با ارزیابی یافته‌های اکوکاردیوگرافی در بیماران بتا

تالاسمی ماژور که با وجود درمان مناسب و منظم باز هم نارسایی قلبی در ۲/۵٪ افراد وجود داشت. عملکرد معیوب بطن چپ در ۷/۵٪ افراد مشاهده شد بطوریکه برون ده قلب نسبت به گروه کنترل افزایش داشت. از نظر تئوری اختلال در فاز دیاستولیک که از علائم اولیه کاردیومیوپاتی ناشی از رسوب آهن است تقریباً در یک سوم افراد وجود داشت و با کاهش انقباض بطن چپ همراه بود. ناهنجاری‌های دیاستولیک که بعنوان علائم اولیه تلقی می‌شود و در دراز مدت موجب اختلال عملکرد بطن چپ در فاز سیستول شود و می‌تواند ارزش پیش‌گویی‌کننده داشته باشد (۱۱ و ۱۲).

اختلال عملکرد دیاستولیک بطن چپ LVDD و بیماری‌های مختلفی در ارتباط است. هیپرتروفی (LVH) یکی از شایع‌ترین ناهنجاری‌های است که باعث القای اختلال عملکرد دیاستولیک می‌شود. شارما و همکارانش طی بررسی بیماران با اختلال عملکرد دیاستولیک بطن چپ خفیف تا متوسط درجه I و II با کسر جهشی حفظ شده در دو گروه با LVH و بدون LVH مشاهده کردن بیماران با LVDD شدیدتر ریسک بالاتری برای هایپرتروفی بطن چپ داشتند (۱۳).

در مطالعه‌ی که روی بیوپسی قلبی بیماران تالاسمی ماژور انجام شد پریکاردیت در کنار میوکاردیت موجب نارسایی قلبی و در نهایت مرگ بیماران بتا تالاسمی ماژور می‌شود. اما در این مطالعه PCR صورت نگرفت تا مشخص شود نفوذ لنفوسیت‌های

باعث افزایش MMP-9، پروتئاز اصلی مسئول پارگی پلاک می‌شود (۲۱). RANKL همچنین در مواد ترومبوز به دست آمده در محل پارگی پلاک هنگام انفارکتوس میوکارد نیز مشاهده شد. در نتیجه RANKL با پیشرفت بیماری‌های قلبی عروقی همراه است (۲۲).

در بررسی‌های بالینی و تجربی بر روی موش‌های با HF القایی نشان داده شد که در قسمت ایسکمیک بطن چپ بیان ژن RANKL افزایش می‌یابد. به این صورت که موش‌های ناک اوت شده برای ژن OPG سطح بالایی از RANKL را از خود نشان داد (به دلیل نبود نقش محافظتی OPG جهت خنثی سازی اثر RANKL برای کلسیفیه شدن عروق) و بالا بودن سطح سرمی RANKL منجر به رسوب کلسیم در دریچه آئورت و بروز تنگی آئورت می‌شود. با رسوب کلسیم تنگ شدن آئورت در درازمدت بطن چپ برای جبران کمبود برون ده قلب دچار هیپرتروفی شده و این خود منجر به اختلال دیاستولیک بطن چپ می‌شود (۲۳).

کیچل و همکاران یک جمعیت بزرگ آینده نگر را مورد مطالعه قرار داد و نشان داد که سطح سرمی پایه RANKL پیش بینی کننده مهم بیماری‌های قلبی عروقی آینده مانند انفارکتوس میوکارد و سکتة مغزی ایسکمیک است (۳).

با این حال مطالعات در مورد ارتباط سطح سرمی RANKL با کلسیفیکاسیون عروق متناقض است بطوریکه در مطالعه‌ی که بر روی ۴۷ بیمار همودیالیز انجام شد و میزان کلسیفیکاسیون عروق را با رادیوگرافی بررسی کردند مشاهده کردند بیماران با سطح پایین RANKL دارای ریسک کلسیفیکاسیون و مشکلات عروقی هستند (۲۴). ادعا شده است که سطح سرمی RANKL هیچ ارتباطی با آترواسکلروز پیشرفته و ضخامت کاروتید ندارد (۲۵ و ۲۶). در مطالعه‌ی ارتباط مثبتی بین سطح سرمی RANKL و کلسیفیکاسیون کاروتید در ضایعات آترواسکلروز و نارسایی قلبی یافت شد (۲۷ و ۲۸).

به نظر می‌رسد تاثیر میزان سطح سرم RANKL با یافته‌های اکوکاردیوگرافی از قبیل کسر جهشی، فشار خون ریوی، هایپرتروفی بطن چپ، اختلال عملکرد دیاستولیک

میوکارد ناشی از عفونت ویروسی یا یک روند التهابی ناشی از آهن یا ترکیبی از هر دو مورد است (۱۴).

فشار خون ریوی، فشار خون بالایی است که در شریان ریه رخ می‌دهد که می‌تواند منجر به مرگ زود هنگام شود و عارضه‌ی است که در افراد تالاسمیک خصوصاً نوع اینترمدیا نیز مشاهده می‌شود اما در مطالعه‌ی که روی ۳۳ بیمار تالاسمی ماژور صورت گرفت فشار خون ریوی بروز قابل توجهی ۶۶ درصد داشت (۱۷-۱۵).

فشار خون ریوی یک عارضه شایع همراه با سندرمهای تالاسمی است و ممکن است در پاتوژنز نارسایی بطن راست نقش مهمی داشته باشد. یافته‌های پژوهشی مطالعه‌ی رشیدی و همکارانش در سال ۲۰۱۸ براساس معیارهای اکوکاردیوگرافی شیوع فشار خون بالا ریوی ثانویه به بتا تالاسمی ۴/۵٪ بود (۱۸).

همانطور که گفته شد علل مشکلات قلبی از جمله نارسایی قلبی بسیار متنوع است، واسطه‌های التهابی از جمله عوامل ایجاد کننده نارسایی قلبی است. افزایش سایتوکاین‌های التهابی مثل فاکتور نکروز کننده تومور  $\alpha(TNF\alpha)$ ،  $IL_1\beta$ ،  $IL_6$  و... در جریان خون و همچنین در میوکارد وجود دارد. شواهد محکمی مبنی بر نقش این واسطه‌ها در هیپرتروفی، فیروز و آپوپتوز دارد (۱۹).

با توجه به نقش واسطه‌ها و سایتوکاین‌های التهابی و ارتباط آنها با بیماری‌های قلبی و اینکه RANKL یکی از اعضای سوپرفامیلی TNF می‌باشد و محور OPG/RANK/RANKL در پاتوژنز مشکلات قلبی عروقی تاثیرگذار است. گمان می‌رود RANKL می‌تواند مستعد کننده بروز مشکلات قلبی در بیماران بتا تالاسمی باشد. کما اینکه در مطالعات گذشته ارتباط RANKL با عوارض عروقی بررسی شده است. گرچه نحوه حضور RANKL در ایجاد این عوارض عروقی مشخص نیست اما برخی شواهد از مطالعات قلبی نشان داده اند که RANKL باعث افزایش کلسیفیکاسیون عروقی و پارگی پلاک می‌شود. RANKL کلسیفیکاسیون سلول‌های عضله صاف را از طریق القای پروتئین مورفوژنتیک استخوان افزایش می‌دهد (۲۰). مشخص شد که RANKL در محل کلسیفیکاسیون عروقی بسیار بیان شده و



حصول اطمینان و رسیدن به نتایج قابل تعمیم به همه جمعیت‌های ایرانی پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بیشتر با جامعه آماری بالاتر انجام شود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مرکز بیماران تالاسمی و هموفیلی سرور به خاطر همکاری بی شائبه و از معاونت تحقیقات دانشکده علوم پزشکی مشهد به خاطر حمایت از انجام این طرح تشکر و قدردانی می‌نمایند.

شاخص توده‌ی بطن چپ و میزان رسوب آهن قلبی در MRIT\*2 در مورد مطالعه حاضر چشمگیر نبوده و ارتباطی نداشته است.

با این حال، این مطالعه محدودیت‌هایی داشت یکی از محدودیت‌های این مطالعه این بود که این پژوهش بصورت پایلوت و با حجم نمونه کم انجام شد. این مطالعه از اولین مطالعات در حیطه‌ی بررسی سطح سرم RANKL و ارتباط آن با مشکلات قلبی بیماران بتا تالاسمی ماژور در جمعیت ایران است و به دلیل نتایج متناقض در جمعیت‌های مختلف برای

### References

- 1.Kremastinos DT, Farmakis D, Aessopos A, Hahalis G, Hamodraka E, Tsiapras D, et al.  $\beta$ -thalassemia cardiomyopathy: history, present considerations, and future perspectives. *Circulation: Heart Failure*. 2010;3(3):451-8.
- 2.Lai K, Huang G, Su L, He Y. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys. *Scientific reports*. 2017 Apr 19;7(1):920. PubMed PMID: 28424478. Pubmed Central PMCID: PMC5430438. Epub 2017/04/21. Eng
- 3.Hahalis G, Alexopoulos D, Kremastinos DT, Zoumbos NC. Heart failure in  $\beta$ -thalassemia syndromes: a decade of progress. *The American journal of medicine*. 2005;118(9):957-6
- 4.Malik S, Syed S, Ahmed N. Complications in transfusion-dependent patients of  $\beta$ -thalassemia major: A review. *Pak J Med Sci*. 2009;25(4):678-8
- 5.Rohani A, Akbari V, Moradipoor M, Akbartabar M. Prevalence of heart failure in the Cases of beta-thalassemia major; two years follow-up. *Journal of Cardio-Thoracic Medicine*. 2013;1(1):16-
- 6.Montecucco F, Steffens S, Mach F. The immune response is involved in atherosclerotic plaque calcification: could the RANKL/RANK/OPG system be a marker of plaque instability? *Clinical and Developmental Immunology*. 2007;2007
- 7.Kiechl S, Schett G, Schwaiger J, Seppi K, Eder P, Egger G, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and risk for cardiovascular disease. *Circulation*. 2007;116(4):385-91
- 8.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 & growth factor reviews*. 2004;15(6):457-75
- 9.Duke M, Abelmann WH. The hemodynamic response to chronic anemia. *Circulation*. 1969;39(4):503-15.
- 10.Kremastinos DT, Farmakis D, Aessopos A, Hahalis G, Hamodraka E, Tsiapras D, et al.  $\beta$ -thalassemia cardiomyopathy: history, present considerations, and future perspectives. *Circulation: Heart Failure*. 2010;3(3):451-8
11. Aessopos A, Berdoukas V, Tsironi M. The heart in transfusion dependent homozygous thalassaemia today-prediction, prevention and management. *European journal of haematology*. 2008;80(2):93-10.
- 12.Bosi G, Crepez R, Gamberini M, Fortini M, Scarcia S, Bonsante E, et al. Left ventricular remodeling, and systolic and diastolic function in young adults with  $\beta$  thalassaemia major: a Doppler echocardiographic assessment and correlation with haematological data. *Heart*. 2003;89(7):762-6
- 13.Kattel S, Memon S, Saito K, Narula J, Saito Y. An effect of left ventricular hypertrophy on mild-to-moderate left ventricular diastolic dysfunction. *Hellenic Journal of Cardiology*. 2016;57(2):92-8
- 14.Kremastinos DT, Tiniakos G, Theodorakis GN, Katrasis DG, Toutouzas PK. Myocarditis in  $\beta$ -thalassemia major: a cause of heart failure. *Circulation*. 1995;91(1):66-71
- 15.Du Z-D, Roguin N, Milgram E, Saab K, Koren A. Pulmonary hypertension in patients with thalassemia major. *American heart journal*. 1997;134(3):532-7.
- 16.Derchi G, Fonti A, Forni GL, Galliera E, Cappellini MD, Turati F. Pulmonary hypertension in patients with thalassemia major. *American heart journal*. 1999;138(2 Pt 1):384.
- 17.Moghaddam HM, Badiei Z, Eftekhari K, Shakeri R, Farhangi H. Prevalence of Pulmonary Hypertension in Patients with Thalassemia Intermedia in 2009: a single center's experience. *Electronic physician*. 2015 Jul;7(3):1102-7. PubMed PMID: 26388975. Pubmed Central PMCID: PMC4574695. Epub 2015/09/22. Eng
- 18.Rashidi F, Sate H, Mohammadi A, Koohi A, Nejati B, Naybzadeh A. Echocardiographic evaluation of prevalence of pulmonary hypertension in beta-thalassemia major: A cross sectional study. *Pediatric hematology and oncology*. 2018 Aug - Sep;35(5-6):322-30. PubMed PMID: 30468099. Epub 2018/11/24. eng.

19. Guo M, Guo G, Ji X. Genetic polymorphisms associated with heart failure: A literature review. *Journal of International Medical Research*. 2016;44(1):15-29.
20. Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, López-Ongil S, et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circulation research*. 2009;104(9):1041-8.
21. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(12):1998-2003.
22. Sandberg WJ, Yndestad A, Øie E, Smith C, Ueland T, Ovchinnikova O, et al. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(4):857-63.
23. Ueland T, Yndestad A, Øie E, Florholmen G, Halvorsen B, Frøland SS, et al. Dysregulated osteoprotegerin/RANK ligand/RANK axis in clinical and experimental heart failure. *Circulation*. 2005;111(19):2461-8.
24. Wei T, Wang M, Wang M, Gan LY, Li X. Relationship of sRANKL level and vascular calcification score to cardiovascular events in maintenance hemodialysis patients. *Blood purification*. 2009;28(4):342-5. PubMed PMID: 19729902. Epub 2009/09/05. Eng
25. Giaginis C, Papadopouli A, Zira A, Katsargyris A, Klonaris C, Theocharis S. Correlation of plasma osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of the nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) levels with clinical risk factors in patients with advanced carotid atherosclerosis. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2012;18(10):CR597.
26. Gaudio A, Privitera F, Pulvirenti I, Canzonieri E, Rapisarda R, Fiore C. Relationships between osteoprotegerin, receptor activator of the nuclear factor  $\kappa$ B ligand and serum levels and carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes mellitus. *Panminerva medica*. 2014;56(3):221-5.
27. Higgins CL, Isbilir S, Basto P, Chen IY, Vaduganathan M, Vaduganathan P, et al. Distribution of alkaline phosphatase, osteopontin, RANK ligand and osteoprotegerin in calcified human carotid atheroma. *The protein journal*. 2015;34(5):315-28.
28. Loncar G, Bozic B, Cvorovic V, Radojicic Z, Dimkovic S, Markovic N, et al. Relationship between RANKL and neuroendocrine activation in elderly males with heart failure. *Endocrine*. 2010 Feb;37(1):148-56. PubMed PMID: 20963564. Epub 2010/10/22. eng

*Original Article***Relationship between serum RANKL concentration and cardiac disorders in beta thalassemia major patients**

Received: 17/12/2019 - Accepted: 05/05/2020

Elham Mahmoudi<sup>1</sup>  
Zahra Badiei<sup>2</sup>  
Hassan Mottaghi moghaddam shahri<sup>3</sup>  
Elham Pourrahim<sup>1</sup>  
Mohammad Hadi Sadeghian<sup>4</sup>  
Mohammad Reza Keramati<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> MSc of Hematology and Blood Banking,  
Mashhad University of Medical Sciences

<sup>2</sup> Associate professor of pediatric  
Hematology & Oncology, Mashhad  
University of Medical Sciences

<sup>3</sup> Professor of Pediatric Cardiology,  
Mashhad University of Medical Sciences

<sup>4</sup> Cancer molecular pathology research  
center, Mashhad University of Medical  
Sciences

Email: keramatimr@mums.ac.ir

**Abstract**

**Introduction:** Major beta thalassemia is a type of autosomal recessive disorder characterized by ineffective erythropoiesis. Constant injections and the body's inability to remove iron from the body lead to an overload of iron, which can damage heart tissue. One of the regulatory pathways for heart disease through iron accumulation is the Osteoprotegerin / RANK pathway (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B / RANKL Receptor Activator of Nuclear Factor Ligand). The purpose of this study was to investigate the serum level of RANKL and its association with left ventricular hypertrophy (LVH), diastolic dysfunction, mutation, pulmonary hypertension, and MRIT \* 2 in major thalassemia patients. Be.HBV.

**Materials and Methods:** This study was performed in descriptive manner on 82 patients with thalassemia major in Kilink Server Mashhad in 1396. All patients were evaluated completely and non-invasively (complete 2D echocardiography and color M-Mode Doppler and MRIT \* 2). The ELISA technique was used to measure serum RANKL levels. Spss20 was used for statistical analysis.

**Results:** Out of 82 patients, 36 were women and 46 were men. The mean age of the patients was 23.6 83 6.83 years. Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction were present in 24 patients (29.30%) and 23 patients (28%), respectively. There was no significant association between RANKL serum and left ventricular hypertrophy, diastolic dysfunction, mutation deficit, pulmonary hypertension, MRIT \* 2 index ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Research has shown that there is no significant relationship between serum RANKL levels and severe left ventricular hypertrophy, diastolic dysfunction, jump deficit, pulmonary hypertension, MRIT \* 2 index, which is the result of more research in this regard. He calls.

**Key words:** Beta thalassemia major, RANKL, echocardiography, MRIT \* 2

**Acknowledgement:** There is no conflict of interest.