

Received: 2009.02.03  
Accepted: 2009.04.06  
Published: 2009.05.15

## Udział RANK, RANKL i OPG w osteolizie towarzyszącej nowotworom

### The participation of RANK, RANKL and OPG in tumor osteolysis

**Marcin Stanisławowski, Zbigniew Kmieć**

Zakład Histologii, Akademia Medyczna w Gdańsku

#### Streszczenie

W ostatnim dziesięcioleciu wykazano, że prawidłowa przebudowa kości jest uwarunkowana dynamiczną równowagą w układzie cytokin wydzielanych głównie przez osteoblasty, tj. RANKL (ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik NF- $\kappa$ B), stymulującego dojrzewanie i aktywność osteoklastów oraz osteoprotegeryny (OPG), która hamuje ten proces poprzez wiązanie się z RANKL. W przebiegu wielu nowotworów często dochodzi do osteolizy. Komórki nowotworowe syntetyzują wiele cytokin (IL-1, IL-6, TNF, MIP-1 $\alpha$ ), które wpływają na układ RANK/RANKL/OPG przez zahamowanie powstawania OPG i jej degradację. Procesy te, w połączeniu ze wzrostem ekspresji RANKL oraz z wytwarzaniem RANKL przez komórki nowotworowe, doprowadzają do zachwiania równowagi RANKL/OPG. Prowadzi to do zwiększonej osteoklastogenezy, aktywacji osteoklastów, a to powoduje istotny spadek masy kostnej. Poznanie mechanizmów osteolizy nowotworowej pozwoliło na podjęcie prób jej zahamowania przez stosowanie związków hamujących aktywność RANKL lub stymulujących aktywność OPG.

**Słowa kluczowe:**

**RANK • RANKL • OPG • osteoklasty • osteoblasty • osteoliza nowotworowa**

#### Summary

It was recently shown that physiological bone remodeling depends on the dynamic balance of two cytokines that are predominantly secreted by osteoblasts. RANKL promotes the differentiation of osteoclastic precursors and the activation of osteoclasts, whereas osteoprotegerin (OPG) inhibits RANKL action. During the development of many tumors, enhanced osteolysis results in pathological bone destruction. Tumor-associated osteolysis is characterized by the degradation and inhibition of osteoprotegerin (OPG) and increased RANKL expression and secretion by tumor tissue. The resulting RANKL/OPG imbalance causes increased generation and activation of osteoclasts and, finally, a significant decrease in bone mass and pathological bone fractures. Tumor cells may also produce many other factors which affect the RANK/RANKL/OPG system and accelerate osteolysis, including IL-1, IL-6, TNF, and MIP-1 $\alpha$ . The elucidation of the key mechanisms of tumor osteolysis has led to clinical trials of biological therapies based on the inhibition of RANKL and stimulation of OPG activity.

**Key words:**

**RANK • RANKL • OPG • osteoclasts • osteoblasts • tumor osteolysis**



**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=885840>

**Word count:** 2693

**Tables:** –

**Figures:** 1

**References:** 69

**Adres autora:** mgr Marcin Stanisławowski, Zakład Histologii, Akademia Medyczna w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk; e-mail: m.stanislawowski@amg.gda.pl

**Wykaz skrótów:** **AP1** – czynnik transkrypcyjny (activator protein-1); **BM-MNC** – komórki jednojądrzaste szpiku myszy (murine bone marrow mononuclear cells); **BMP** – białko morfogenetyczne kości (bone morphogenetic protein); **CT** – kalcytonina (calcitonin); **DKK-1** – białko hamujące drogę przekazu sygnału Wnt (dickkopf 1 protein); **ET-1** – endotelina 1 (endothelin-1); **FDCR-1** – receptor komórki dendrytycznej (follicular dendritic cell-derived receptor-1); **FGF** – fibroblastyczny czynnik wzrostu (fibroblast growth factor); **bFGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor); **sFRP-2** – rozpuszczalne białko hamujące drogę przekazu sygnału Wnt (soluble Frizzled-related protein-2); **Gab2** – białko adaptorowe (Grb-2-associated binder); **HGF** – wątrobowy czynnik wzrostu (hepatocyte growth factor); **IFN-γ** – interferon gamma; **IL** – interleukina; **IGF** – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor); **LIF** – czynnik hamujący białaczkę (leukemia inhibitory factor); **MAPK** – kinazy białkowe aktywowane przez mitogen (mitogen-activated protein kinases); **M-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (macrophage colony-stimulating factor); **MDA-BF-1** – czynnik związany z przerzutami do kości (bone metastasis-related factor); **MIP** oraz **MIP-1α** – białko zapalne makrofagów (-1α) (macrophage inflammatory protein-1-α); **MMP** – metaloproteinazy macierzy (matrix metalloproteinase); **NF-κB** – czynnik jądrowy κB (nuclear factor κB); **OCIF** – czynnik hamujący osteoklastogenezę (osteoclastogenesis inhibitory factor); **ODAR** – receptor różnicowania i aktywacji osteoklastów (osteoclast differentiation and activation receptor); **ODF** – czynnik różnicowania osteoklastów (osteoclast differentiation factor); **OPG** – osteoprotegeryna (osteoprotegerin); **OPG-Fc** – rekombinowana ludzka osteoprotegeryna (human osteoprotegerin: Fc domain fusion protein); **OPGL** – ligand osteoprotegeryny (osteoprotegerin ligand); **OSM** – onkostatyna M (oncostatin M); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); **PGE2** – prostaglandyna E2; **PI-3K** – kinaza 3 fosfatydyloinozytolu (phosphatidylinositol 3-kinase); **PSA** – swoisty antygen gruczołu krokowego (prostate-specific antygen); **PTH** – parathormon (parathormon); **PTH-rP** – białko o działaniu podobnym do parathormonu (parathyroid hormone-related peptide); **RANK** – receptor aktywujący jądrowy czynnik NF-κB (receptor activator of nuclear factor NF-κB); **RANKL** – ligand RANK (receptor activator of nuclear factor NF-κB ligand); **sRANKL** – rozpuszczalna postać liganda RANK (soluble RANKL); **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor); **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor); **TNFR** – receptor czynnika martwicy nowotworu (tumor necrosis factor receptor); **TR-1** – osteoprotegeryna (TNF receptor-like molecule-1); **TRAF** – białka adaptorowe (TNF receptor-associated factors); **TRANCE** – cytokina aktywująca związana z TNF (TNF-related activation-induced cytokine); **TRANCE-R** – receptor TRANCE (TRANCE-receptor); **uPA** – urokinazowy aktywator plazminogenu (urokinase plasminogen activator); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor); **VIP** – naczynioaktywny peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide); **Wnt** – białko wydzielnicze typu wingless (Wingless-type).

## WSTĘP

W zdrowej kości równowaga między procesami jej powstawania i resorpcji (tzw. remodeling) nie jest zakłócona, ponieważ aktywność osteoblastów i osteoklastów jest zrównoważona. Istnieje kilka schorzeń uwarunkowanych genetycznie, takich jak dziedziczna postępująca osteoliza czy choroba Pageta, w których dochodzi do zachwiania gospodarki wapniowej organizmu. W chorobach związanych ze stanem zapalnym (reumatoidalne zapalenie stawów,

schorzenia przyzębia), chorobach metabolicznych kości (osteoporoza postmenopauzalna i posteroidea), a także w wielu nowotworach (szpiczak mnogi, stadium przerzutowe raka piersi lub płuc) dochodzi do stopniowej demineralizacji tkanki kostnej. Proces ten jest spowodowany wzrostem aktywności i liczby osteoklastów [3,8,17,19,20,33,47,51,60]. Właściwe funkcjonowanie i dojrzewanie komórek kościogubnych regulowane jest przez osteoprotegerynę (OPG), receptor aktywujący jądrowy czynnik NF-κB (RANK) oraz ligand RANK, czyli RANKL [3,7,8,17,24,33].

Równowaga między RANKL a OPG odgrywa główną rolę w utrzymaniu odpowiedniego bilansu kostnego.

### KOMÓRKI KOŚCIOTWÓRCZE – OSTEOLASTY

Osteolasty regulują różnicowanie komórek kościogubnych poprzez ekspresję RANKL, aktywującego rozwój osteoklastów oraz przez wydzielanie osteoprotegeryny (OPG), która blokuje działanie RANKL [35]. Komórki kościotwórcze pochodzą z multipotencjalnych, mezenchymalnych komórek macierzystych i odpowiadają za wydzielanie składników organicznych istoty międzykomórkowej kości, czyli kolagenu typu I oraz proteoglikanów, a także za syntezę osteonektyny, osteopontyny, osteokalcyny i proteinaz [36,60]. Na aktywację proliferacji i dojrzewanie osteoblastów wpływają liczne czynniki wzrostu (BMP, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IGF1, IGF2, FGF, PDGF, VEGF) oraz białko Wnt [35]. Ponadto stwierdzono, że cytokiny prozapalne, takie jak TNF i IL-1 przyczyniają się do indukcji komórek kościotwórczych i zwiększenia ekspresji RANKL, co prowadzi do zaburzenia metabolizmu kości [6,61]. Osteolasty są komórkami wielkości 20–30  $\mu$ m, których funkcje regulują również parathormon (PTH) oraz 1,25-dihydroksywitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Zawierają zasadochłonną cytoplazmę bogatą w szorstką siateczkę śródplazmatyczną oraz okrągłe i pęcherzykowate jądro.

### KOMÓRKI KOŚCIOGUBNE – OSTEOKLASTY

Prekursorami osteoklastów są hematopoetyczne komórki linii monocytarno-makrofagalnej, które różnicują się, a następnie łączą, tworząc dojrzałą, w pełni aktywną postać wielojądrzastą [8,49]. Komórki kościogubne mają wielkość 50–100  $\mu$ m, rozbudowany aparat Gołgiego oraz kwasochłonną cytoplazmę bogatą w polirybosomy, lizosomy i mitochondria. Osteoklasty charakteryzują się biegunowością, spowodowaną występowaniem pofalowań błony komórkowej w postaci mikrokosmków od strony powierzchni kości (tzw. rąbek brzeżny) i obecnością dużej liczby organelli komórkowych na przeciwległym końcu. Rąbek brzeżny pełni ważną funkcję w procesie resorpcji kości, który przebiega w zatokach erozyjnych (Howshipa) [36], zaś kontakt osteoklastów z macierzą kostną zachodzi dzięki obecności na ich powierzchni integrynom  $\alpha$ v $\beta$ 3 [21]. Funkcjonowanie komórek kościogubnych jest ściśle kontrolowane i zachodzi za pośrednictwem ujemnego sprzężenia zwrotnego polegającego na zapoczątkowaniu ich apoptozy przez produkty rozkładu macierzy organicznej kości. Następujące czynniki hamują powstawanie i aktywność osteoklastów: OPG, TGF- $\beta$ , bisfosfoniany, kalcytonina, estrogeny, IL-4, IL-18, IFN- $\gamma$ , FGF-2 (bFGF) [14,49,60]. Z kolei IL-1, IL-6, IL-11, PGE<sub>2</sub>, M-CSF, TNF oraz witamina D<sub>3</sub> indukują tworzenie osteoklastów przez stymulowanie wytwarzania RANKL przez osteolasty i komórki zrębu szpiku kostnego [49,67]. U człowieka, przeciętny czas życia osteoklastów wynosi około dwóch tygodni, zaś osteoblastów 3 miesiące [36]. Degradacja kości prowadzi do uwalniania z jej macierzy lokalnych czynników wzrostu (BMP, TGF- $\beta$ , FGF) stymulujących dojrzewanie prekursorów osteoblastów, które wydzielają osteoprotegerynę (OPG), główny inhibitor osteoklastogenezy.

### OSTEOPROTEGERYNA

OPG należy do rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów (TNFR) i jest syntetyzowana przede wszystkim

przez osteolasty oraz liczne narządy: płuca, jelita, wątrobę, żołądek, nerki, skórę, trzustkę, kości, szpik kostny, śledzionę, węzły chłonne, grasicę, mózg, prostatę, jajnik, tarczycę i układ sercowo-naczyniowy [24,33,36,53,63,66]. Poza osteoblastami syntezę OPG wykazano m.in. w komórkach śródbłonna, komórkach zrębu szpiku, komórkach dendrytycznych, limfocytach B i T, fibroblastach i komórkach mięśniówki gładkiej aorty. Białko to zostało odkryte w 1997 roku przez kilka zespołów badawczych, dlatego w użyciu można spotkać jego liczne synonimy: FDCR-1, TR-1 i OCIF [33,53,63]. OPG jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 60 kDa (postać monomeryczna) lub 120 kDa (postać homodimeru). Pełni ona rolę rozpuszczalnego receptora kompetycyjnego RANKL, przez co hamuje różnicowanie prekursorów osteoklastów (osteoklastogenezę) (ryc. 1B) [3,48,53]. Na zwiększenie ekspresji OPG wpływają obciążenia mechaniczne wywierane na kość, 17 $\beta$ -estradiol, białka morfogenetyczne kości (BMP), interleukiny (IL-1 $\alpha$ , -6, -11, -13, -18), czynniki wzrostu (TGF- $\beta$ 1, PDGF) oraz OSM [33,48,53,63]. Do inhibitorów wytwarzania OPG należą glukokortykoidy, leki immunosupresyjne, PGE<sub>2</sub>, parathormon (PTH), witamina D<sub>3</sub> i jej pochodne oraz bFGF [33,48,53]. W badaniach na myszach transgenicznym dowiedziono, że nadekspresja OPG prowadzi do znacznej osteopetrozy, powiązanej ze spadkiem tempa osteoklastogenezy [19]. Stwierdzono, że u ludzi OPG koreluje z ciężkością i progresją zmian miażdżycowych w tętnicach szyjnych i naczyniach wieńcowych stanowiąc niezależny czynnik ryzyka miażdżycy [25,53].

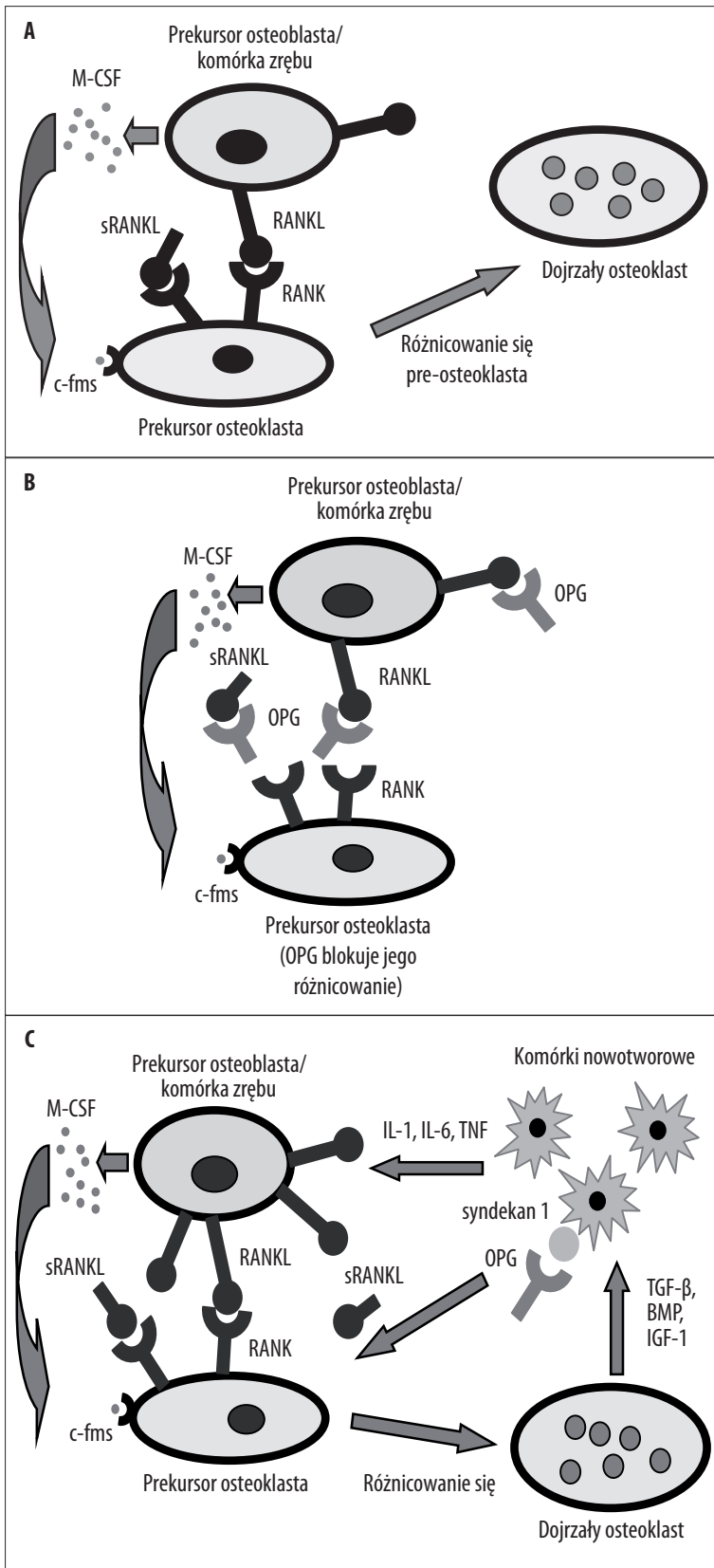
### RECEPTOR AKTYWUJĄCY JĄDROWY CZYNNIK NF- $\kappa$ B (RANK)

RANK jest glikoproteiną typu I z rodziny receptorów TNF, będącą receptorem RANKL, głównej cytokiny pobudzającej rozwój i dojrzewanie osteoklastów. Białko to znane jest też pod synonimami TRANCE-R i ODAR [33,63]. Występowanie RANK wykazano w kościach, a także w szpiku kostnym, mózgu, sercu, nerkach, grasicy, wątrobie, płucach, jelitach, mięśniach szkieletowych, nadnerczach, trzustce, prostatie i skórze [1,63,66]. RANK- białko błonowe o masie 90 kDa, jest wytwarzane w prekursorach osteoklastów i dojrzałych osteoklastach, w fibroblastach, komórkach dendrytycznych, limfocytach T i B, komórkach śródbłonna, chondrocytach oraz w komórkach nowotworowych [1,7,24,33,38,63,66]. Na zwiększoną ekspresję RANK mają wpływ witamina D<sub>3</sub>, TGF- $\beta$ , onkostatyna M (OSM), IFN- $\gamma$ , IL-1, MIP-1 $\alpha$ , RANKL, VIP, natomiast IL-4 zmniejsza liczbę cząsteczek RANK na powierzchni osteoklastów [33,63].

### LIGAND RANK (RANKL)

RANKL należy do rodziny białek czynnika martwicy nowotworów (TNF). Cytokina ta była także określana jako czynnik różnicowania osteoklastów (ODF), ligand osteoprotegeryny (OPGL) lub TRANCE [15,23,33,59,63]. U człowieka i myszy odkryto 3 izoformy RANKL, z których RANKL1 i RANKL2 są glikoproteinami typu II związanymi z błoną komórkową, natomiast RANKL3 występuje w postaci rozpuszczalnej jako tzw. sRANKL [23,59,63]. Obecność mRNA dla RANKL zaobserwowano m.in. w węzłach chłonnych, śledzionie, grasicy, kościach, szpiku kostnym, sercu, łożysku, mięśniach szkieletowych, mózgu, nerkach, wątrobie, żołądku, tarczycy i płucach [1,7,24,33,63,66]. IL-13,





Ryc. 1. Udział układu RANK/RANKL/OPG i czynników osteolitycznych w regulacji osteoklastogenezy: **A** – aktywacja różnicowania prekursora osteoklasta przez M-CSF i RANKL, **B** – osteoprotegeryna hamuje różnicowanie i dojrzewanie osteoklastów, **C** – stymulacja osteoklastogenezy przez czynniki osteolityczne (IL-1, IL-6, TNF, sRANKL, syndekan 1) oraz zwiększenie proliferacji komórek nowotworowych pod wpływem cytokin wydzielanych przez osteoklasty (TGF- $\beta$ , BMP, IGF-1)

TGF- $\beta$ 1 obniżają, a IL-1 $\beta$ , -6, -7, -11, -17, OSM, IFN- $\gamma$ , TNF, PTH, witamina D $_3$ , deksametazon, PGE $_2$  – zwiększają ekspresję RANKL [33,48,53,63,66]. RANKL jest wytwarzany

przez osteoblastyczną linię komórek (dojrzałe osteoblasty i ich prekursorzy), chondrocyty, fibroblasty, śródbłonek, komórki zrębu szpiku kostnego, komórki nowotworowe oraz

aktywne limfocyty T. RANKL z udziałem M-CSF aktywuje osteoklastogenezę i blokuje apoptozę osteoklastów, łącząc się z RANK obecnym na powierzchni osteoklastów (ryc. 1A) [3,19,27,33,48,53,55,63,66]. Doświadczenia przeprowadzone na myszach pozbawionych genu kodującego RANKL, wykazały, że brak tego białka prowadzi nie tylko do ciężkiej osteopetrozy i wadliwego wyrzynania się zębów, ale jednocześnie upośledza różnicowanie limfocytów T i B. U takich zwierząt nie dochodzi też do rozwoju węzłów chłonnych [10]. RANKL może również uczestniczyć w regeneracji mysiej grasicy poprzez stymulowanie podziałów grasiczych komórek nabłonkowych [31].

#### **POWSTAWANIE OSTEOKLASTÓW JAKO PODSTAWOWY MECHANIZM AKTYWACJI RESORPCJI KOŚCI**

Warunkiem koniecznym do zainicjowania procesu różnicowania prekursorów osteoklastów jest aktywacja receptora c-fms przez jego ligand M-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów), syntetyzowany w osteoblastach i komórkach zrębu szpiku kostnego [6,33,48]. Kolejnym etapem jest wiązanie RANKL z RANK, po którym następuje pobudzenie niedojrzałego osteoklasta do wielu zmian prowadzących do wykształcenia się komórki zdolnej do resorpcji kości (ryc. 1A) [6,48,66]. Aktywowany przez ligand RANK, dzięki takim białkom adaptorowym jak TRAF i Gab2, stymuluje wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne obejmujące m.in. NF- $\kappa$ B, MAPK i PI-3K, które uczestniczą w kontroli osteoklastogenezы. Kinazy MAP uczestniczą w regulacji funkcjonowania czynników transkrypcyjnych z rodziny AP-1 (c-Jun, JunB, c-Fos i Fra), sterujących ekspresją genów niezbędnych do prawidłowego dojrzewania osteoklastów [3,7,8,33,60,66].

#### **ROLA UKŁADU RANK/RANKL/OPG W ZABURZENIACH TKANKI KOSTNEJ TOWARZYSZĄCYCH NOWOTWOROM**

U zdecydowanej większości pacjentów cierpiących na zaawansowane stadium wielu nowotworów (m.in. raka piersi, płuc, nerki lub prostaty) pojawiają się przerzuty do kości długich, kręgosłupa, miednicy, żeber i czaszki. Osoby te przeważnie doświadczają dotkliwego bólu związanego z postępującą osteolizą. Jednocześnie występują hiperkalcemia, zwiększenie łamliwości i deformacje tkanki kostnej, czasem ucisk rdzenia kręgowego przez złamane kręgi oraz niedokrwistość [17,19,22,35,41,65,67,68]. Znaczny wzrost stężenia wapnia we krwi chorych, który jest następstwem rozległej osteolizы, charakteryzuje nie tylko raka piersi i płuc, ale również szpiczaka mnogiego, raki jajnika i trzustki. Do hiperkalcemii dochodzi w wyniku wytwarzania przez komórki guza białka o działaniu podobnym do parathormonu (PTH-rP) [41].

Zmiany zachodzące w tkance kostnej wskutek powstawania przerzutów dzielone są na osteolityczne (rak piersi, płuc, nerki, szpiczak mnogi) i osteoblastyczne (rak prostaty), przy czym u osób z rakiem płuc i prostaty zaobserwowano dwa typy przekształceń. W sytuacji wydzielania przez komórki nowotworowe cytokin stymulujących osteoklastogenezę, występuje osteoliza, a w przypadku wytwarzania aktywatorów procesu mineralizacji dochodzi do przekształceń osteoblastycznych [35,41,65]. Postępująca degradacja kości jest ściśle związana z zachwianiem równowagi w układzie RANK/RANKL/OPG [60,63,65].

#### **PRZEKSZTAŁCENIA OSTEOLITYCZNE TOWARZYSZĄCE NOWOTWOROM**

W przebiegu nowotworów występują najczęściej zmiany osteolityczne, które zwykle prowadzą do powstania tzw. „błędne koła” – wzajemnych interakcji między komórkami nowotworowymi, osteoklastami i osteoblastami (ryc. 1C). Następstwem tych oddziaływań jest niszczenie kości oraz nasilona proliferacja komórek guza [3,17,41,65,67,68]. Do syntetyzowanych przez nowotwór czynników pobudzających różnicowanie, namnażanie i aktywację komórek kościogubnych należą IL-1, -6, -8, -11, TNF, sRANKL, M-CSF, TGF- $\beta$ , VEGF, MMP, PTH, PTH-rP i prostaglandyny [19,22,41,60,65,67,68]. IL-1, -6, -8 i TNF są cytokinami mogącymi stymulować osteoklastogenezę w sposób niezależny od RANKL, podczas gdy M-CSF wzmacnia wytwarzanie RANKL przez komórki podścieliska i przedłuża funkcjonowanie osteoklastów blokując ich apoptozę [4,65].

W następstwie osteolizы nowotworowej osteoklastы syntetyzują kilka czynników wzrostu, w tym BMP, IGF-1, TGF- $\beta$  i bFGF. Wzmagają one proliferację komórek nowotworowych, co prowadzi do sekrecji większej ilości czynników proosteolitycznych (ryc. 1C) [16,39,41,65,67,68]. TGF- $\beta$  i uwolnione jony Ca<sup>2+</sup> stymulują komórki nowotworowe do wydzielania PTH-rP, które aktywuje osteoblastы do ekspresji RANKL [68,69]. W ten sposób dochodzi do zamknięcia „błędne koła” autostymulacji rozkładu kości w przebiegu nowotworu.

#### **SZPICZAK MNOGI**

Nowotwór ten powstaje z limfocytów B i rozwija się w szpiku kostnym wywołując stopniową osteolizę spowodowaną nadmierną aktywnością osteoklastów wskutek zwiększonej ekspresji RANKL i zahamowaniem powstawania OPG [15,42,46,48,55,60,67]. Chorobie towarzyszy wytwarzanie białka monoklonalnego, uporczywy ból kości, patologiczne złamania, powikłania ze strony układu nerwowego wywołane uciskiem rdzenia kręgowego oraz hiperkalcemia prowadząca do uszkodzenia nerek [19,42,43,50,57,67]. Obniżenie stężenia osteoprotegeryny w surowicy krwi chorych na szpiczaka w porównaniu ze zdrowymi osobami wynika m.in. z możliwości wiązania, internalizacji i degradacji OPG przez komórki szpiczaka. Adhezja OPG do powierzchni komórek nowotworowych zachodzi za pośrednictwem śródbłonowego proteoglikanu, syndekanu 1 (CD 138) (ryc. 1C) [3,17,19,55,58,67]. Nowotwór wytwarza wiele czynników stymulujących powstawanie dojrzałych osteoklastów, takich jak RANKL, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-11, -6, -3, -1 $\beta$ , TNF, limfotoksyna- $\alpha$ , PTH-rP, HGF oraz VEGF [15,19,42,43,46,50,62,67]. Komórki szpiczaka odpowiadają również za supresję różnicowania osteoblastów wydzielając inhibitory szlaku Wnt, DKK-1 i sFRP-2 [29,35,42,43,50,62]. Ponadto wiele danych wskazuje, że IGF-1 wzmacnia pro wzrostowy efekt IL-6 wywierany na komórki szpiczaka mnogiego oraz może indukować podziały komórek nowotworowych [57].

#### **RAK PIERSI**

W raku piersi głównym czynnikiem odpowiedzialnym za pobudzenie osteoklastogenezы jest PTH-rP, który zwiększa ekspresję RANKL i obniża poziom OPG [19,41,45,64,65,67]. Komórki guza nie wytwarzają RANKL, mogą za to wpływać na komórki szpiku kostnego lub osteoblastы zwiększając jego syntezę. Oprócz PTH-rP, komórki



nowotworowe syntetyzują kilka cytokin oddziałujących na różnicowanie osteoklastów, takich jak IL-1, -6, -11, PGE2, TNF, LIF i OPG [3,11,39,45,64].

### RAK PŁUCA

U osób z rakiem płuca większość zmian chorobowych zachodzących w kościach ma charakter osteolityczny. Potwierdziły to badania *in vitro*, wykazujące wydzielanie przez komórki nowotworowe RANKL, IL-1, IL-8, PTHrP i TNF. Nielicznym w tym przypadku przekształceniom osteoblastycznym sprzyjają, wytwarzane przez komórki nowotworowe, BMP-2, BMP-4 oraz OPG [16].

### RAK NERKI

W prawie 30% przypadków, rak nerki wywołuje rozległą osteolizę, silne bóle kości i patologiczne złamania. Jednym z wielu czynników biorących udział w zaburzeniach metabolizmu kostnego jest MIP-1 $\delta$  (CCL15), którego stężenie jest zdecydowanie wyższe w fazie przerzutowej raka nerki niż w prawidłowym szpiku kostnym. Receptorami tej chemokiny są CCR1 i CCR3, obecne na prekursorach osteoklastów i na dojrzałych komórkach kościogubnych. W doświadczeniach na liniach komórkowych BM-MNC i RAW264.7 wykazano, że MIP-1 $\delta$  znacznie przyspiesza osteoklastogenezę zależną od RANKL [28].

### GUZ OLBRYMIOKOMÓRKOWY KOŚCI

Nowotwór ten cechuje obecność wielojądrowych komórek olbrzymich podobnych do osteoklastów oraz nadmierna synteza RANKL i RANK [17,19,67]. Do podobnej sytuacji dochodzi w białaczkach u pacjentów z zaawansowaną hiperkalcemią znacznie wzrasta wytwarzanie RANKL przez limfocyty T [63,67].

### PRZEKSZTAŁCENIA OSTEOLASTYCZNE TOWARZYSZĄCE NOWOTWOROM

W przebiegu rozwoju niektórych nowotworów w kościach może dochodzić także do przekształceń osteoblastycznych, które zachodzą w wyniku sekrecji przez komórki nowotworowe licznych stymulatorów osteogenezy. Należą do nich czynniki wzrostu (BMP, IGF-1, IGF-2, IL-6, TGF- $\beta$ , PDGF, FGF-1, FGF-2, FGF-8, VEGF), a także inne związki, takie jak białko Wnt, ET-1, OPG, uPA, MDA-BF-1 oraz PSA [26,34,41,65]. Z kolei zaktywowane osteoblasty wydzielają TGF- $\beta$ , BMP i VEGF, które pobudzają rozwój guza [65].

### RAK PROSTATY

Komórki ludzkiego raka prostaty charakteryzuje zarówno nadmierne wytwarzanie RANKL, który wiążąc się bezpośrednio z RANK, indukuje dojrzewanie osteoklastów, jak i synteza czynników biorących udział w formowaniu kości, czyli BMP, TGF- $\beta$  i OPG [65]. Komórki nowotworowe poza syntezą RANKL i OPG są zdolne do wydzielania RANK, IL-11, IGF-1, PDGF, FGF, VEGF, MDA-BF-1, uPA oraz PSA [2,13,35,39,40]. W zaawansowanej, inwazyjnej postaci raka prostaty, wszystkie elementy układu RANK/RANKL/OPG ulegają znaczącej ekspresji w porównaniu z wyjściową postacią nowotworu, przy czym poziom OPG jest stosunkowo najwyższy [13,35,48]. Dochodzi również do wzmożonej se-

krekcji endoteliny 1 (ET-1), co prowadzi do wzrostu liczby osteoblastów, zwiększonej mineralizacji, spadku mobilności osteoklastów oraz pobudzenia wydzielania innych czynników wzrostu o charakterze osteogennym [35,41,65]. Ten typ nowotworu cechują podwyższona ilość białka Wnt, wspomagającego różnicowanie osteoblastów, przy jednoczesnej inaktywacji osteoklastów oraz wytwarzanie na wczesnym etapie fazy przerzutowej – białka DKK-1, inhibitora szlaku Wnt [12,18,35,65]. Doświadczenia przeprowadzone na liniach komórkowych ludzkiego raka prostaty, płuc i piersi wykazały syntezę białka morfogenetycznego kości 2 (BMP-2) stymulującego proliferację, funkcjonowanie i przeżywalność osteoblastów, a także zwiększającego wytwarzanie OPG [9,35,65]. Inny czynnik proosteoblastyczny, TGF- $\beta$ 2, który jest wydzielany w znacznych ilościach przez linie komórkowe PC3 raka prostaty, odpowiada za wzrost liczby podziałów osteoblastów *in vitro* oraz przyspieszenie procesów kościotwórczych *in vivo* [35,41]. Najnowsze badania sugerują, że RANKL może stymulować przerzuty do kości w raku prostaty i piersi, w przeciwieństwie do OPG, która blokuje ten proces. Hipoteza ta jest oparta na doświadczeniach, w których wykazano, że RANKL jest czynnikiem aktywującym inwazyjny charakter komórek raka prostaty z linii PC3 i DU145 [2,3,11,30,39].

### OSTEOSARKOMA

Kostniakomięsak (*osteosarcoma*, mięsak kościopochodny) należy do nowotworów złośliwych pochodzących z przekształconych komórek osteoblastycznych i najczęściej rozwija się jako ekspansywny, niewywołujący osteolizy guz kości [19]. Przeważnie występuje w młodym wieku i powoduje przerzuty głównie do płuc [30]. W większości przypadków wykazano brak obecności mRNA dla RANKL w tkance kostnej z kostniakomięsakiem, podczas gdy RANKL był wytwarzany przez zdrową kość. Stwierdzono także wysoki poziom mRNA dla OPG w kilku liniach komórkowych osteosarkomy [19]. W innych badaniach dowiedziono obecności funkcjonalnego RANK w mysich liniach kostniakomięsaka POS-1 oraz ludzkich liniach komórkowych osteosarkomy MG-63, Saos-2 i MNNG/HOS [30,39]. U pacjentów z kostniakomięsakiem wykazano metodą immunocytochemiczną niewielką ekspresję RANKL w osteoblastach i podwyższone wytwarzanie OPG, co zaburzało stosunek RANKL/OPG i prowadziło do kościotworzenia [17]. Znacznie rzadziej w przebiegu kostniakomięsaka obserwowano resorpcję kości [17,30].

### TERAPIE STOSOWANE W WALCE Z OSTEOLIZĄ NOWOTWOROWĄ

W leczeniu zaburzeń metabolizmu kostnego obiecujące są dane dotyczące stosowania leków antyresorpcyjnych (bisfosfonianów) oraz przeciwciał monoklonalnych (denosumab) skierowanych przeciwko RANKL. Bisfosfoniany, hamując dojrzewanie preosteoklastów i aktywność dojrzałych osteoklastów oraz indukując ich apoptozę, przyczyniają się do redukcji zmian osteolitycznych występujących w wielu nowotworach [32,44,60,62]. Związki te obniżają syntezę RANKL i wzmagają wytwarzanie OPG [3,44,48]. Ponadto bisfosfoniany nie tylko stymulują apoptozę komórek nowotworowych i zmniejszają ich proliferację, ale również wyraźnie ograniczają zdolności przerzutowe guza [3,41,52,69]. Wśród bisfosfonianów dużą efektywność antyresorpcyjną wykazują kłodronian (rak piersi, szpiczak mnogi), ibandronian (rak piersi), pamidronian (rak piersi,

szpiczak mnogim), kwas zoledronowy (rak prostaty, piersi, szpiczak mnogim) [5,32,34,41,52,62,69].

Zastosowanie ludzkich przeciwciał monoklonalnych wysoce swoistych wobec RANKL (denosumab, AMG 162) blokuje wiązanie RANKL do RANK i tym samym utrudnia osteoklastogenezę [3,5,37,56,65]. Skuteczność antyosteolityczna tych immunoglobulin, jest potwierdzana w badaniach klinicznych u pacjentów chorujących na raka prostaty i piersi lub szpiczaka mnogiego [3,5,54,65].

Wykorzystanie raloksyfenu, będącego przedstawicielem leków z grupy SERM (selective estrogen response modulators) nie tylko ogranicza degradację kości, ale dodatkowo minimalizuje niebezpieczeństwo wystąpienia raka piersi. U kobiet w wieku postmenopauzalnym przyjmujących raloksyfen przez 8 lat zaobserwowano 66% redukcję ryzyka zachorowania na inwazyjną postać raka piersi w porównaniu z grupą kontrolną [56].

Działanie wielu leków hamujących resorpcję sprowadza się do jednego głównego mechanizmu opartego na podnoszeniu stężenia OPG oraz inaktywacji RANKL. Doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach wskazują, że OPG ograni-

cza hiperkalcemię, przerzuty do kości, proliferację komórek nowotworowych oraz osteolizę w przebiegu szpiczaka mnogiego, raka piersi, płuc i prostaty [3,30]. Zahamowanie aktywności RANKL za pomocą rekombinowanej osteoprotegeryny (OPG-Fc) wywołuje apoptozę komórek nowotworowych i obniża ich migrację, co przyczynia się do zahamowania przekształceń osteolitycznych [11]. Pacjenci ze szpiczakiem mnogim lub rakiem piersi po podskórnym podaniu dawki OPG-Fc wykazywali zmniejszony poziom degradacji kości. Należy jednak zaznaczyć, że OPG może pełnić rolę czynnika przeżyciowego dla komórek nowotworowych w ludzkim raku piersi i prostaty [3].

Przedstawione dane świadczą o złożoności procesów komórkowych i molekularnych związanych z towarzyszącymi nowotworem zmianami osteolitycznymi, rzadziej osteoblastycznymi kości. Niewątpliwie osteoliza jest procesem, w którym obserwujemy wzrost stężenia RANKL, przy jednoczesnym spadku wytwarzania OPG, co nasila powstawanie osteoklastów i w rezultacie prowadzi do nadmiernej resorpcji tkanki kostnej. Wykryte w ostatnich latach cytokiny odpowiedzialne za gospodarkę wapniową organizmu są obecnie wykorzystywane w próbach klinicznych, których celem jest zahamowanie osteolizy nowotworowej.

## PIŚMIENICTWO

- Anderson D.M., Maraskovsky E., Billingsley W.L., Dougall W.C., Tometsko M.E., Roux E.R., Teepe M.C., DuBose R.F., Cosman D., Galibert L.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997; 390: 175–179
- Armstrong A.P., Miller R.E., Jones J.C., Zhang J., Keller E.T., Dougall W.C.: RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate*, 2008; 68: 92–104
- Baud'huin M., Duplomb L., Ruiz Velasco C., Fortun Y., Heymann D., Padrines M.: Key roles of the OPG–RANK–RANKL system in bone oncology. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2007; 7: 221–232
- Bendre M.S., Margulies A.G., Walser B., Akel N.S., Bhattacharya S., Skinner R.A., Swain F., Ramani V., Mohammad K.S., Wessner L.L., Martinez A., Guise T.A., Chirgwin J.M., Gaddy D., Suva L.J.: Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand pathway. *Cancer Res.*, 2005; 65: 11001–11009
- Body J.J., Facon T., Coleman R.E., Lipton A., Geurs F., Fan M., Holloway D., Peterson M.C., Bekker P.J.: A study of the biological receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 1221–1228
- Boyce B.F., Li P., Yao Z., Zhang Q., Badell I.R., Schwarz E.M., O'Keefe R.J., Xing L.: TNF- $\alpha$  and pathologic bone resorption. *Keio J. Med.*, 2005; 54: 127–131
- Boyce B.F., Xing L.: Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9(Suppl.1): S1
- Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L.: Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003; 423: 337–342
- Brubaker K.D., Corey E., Brown L.G., Vessella R.L.: Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines. *J. Cell. Biochem.*, 2004; 91: 151–160
- Burgess L.T., Qian Y.X., Kaufman S., Ring B.D., Van G., Capparelli C., Kelley M., Hsu H., Boyle W.J., Dunstan C.R., Hu S., Lacey D.L.: The ligand for osteoprotegerin (OPG) directly activates mature osteoclasts. *J. Cell Biol.*, 1999; 145: 527–538
- Canon J.R., Roudier M., Bryant R., Morony S., Stolina M., Kostenuik P.J., Dougall W.C.: Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*, 2008; 25: 119–129
- Chen G., Shukeir N., Potti A., Sircar K., Aprikian A., Goltzman D., Rabbani S.A.: Up-regulation of Wnt-1 and  $\beta$ -catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer*, 2004; 101: 1345–1356
- Chen G., Sircar K., Aprikian A., Potti A., Goltzman D., Rabbani S.A.: Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer*, 2006; 107: 289–298
- Chikazu D., Katagiri M., Ogasawara T., Ogata N., Shimoaka T., Takato T., Nakamura K., Kawaguchi H.: Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: stimulation of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoblasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors. *J. Bone Miner. Res.*, 2001; 16: 2074–2081
- De Leenheer E., Mueller G.S., Vanderkerken K., Croucher P.I.: Evidence of a role for RANKL in the development of myeloma bone disease. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2004; 4: 340–346
- Feeley B.T., Liu N.Q., Conduah A.H., Krenk L., Roth K., Dougall W.C., Huard J., Dubinett S., Lieberman J.R.: Mixed metastatic lung cancer lesions in bone are inhibited by noggin overexpression and Rank:Fc administration. *J. Bone Miner. Res.*, 2006; 21: 1571–1580
- Grimaud E., Soubigou L., Couillaud S., Coipeau P., Moreau A., Passuti N., Gouin F., Redini F., Heymann D.: Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am. J. Pathol.*, 2003; 163: 2021–2031
- Hall C.L., Kang S., MacDougald O.A., Keller E.T.: Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. *J. Cell. Biochem.*, 2006; 97: 661–672
- Hofbauer L.C., Neubauer A., Heufelder A.E.: Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer*, 2001; 92: 460–470
- Hofbauer L.C., Schoppet M.: Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*, 2004; 292: 490–495
- Horton M.A.: Integrin antagonists as inhibitors of bone resorption: implications for treatment. *Proc. Nutr. Soc.*, 2001; 60: 275–281
- Huang L., Cheng Y.Y., Chow L.T., Zheng M.H., Kumta S.M.: Tumour cells produce receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) in skeletal metastases. *J. Clin. Pathol.*, 2002; 55: 877–878
- Ikeda T., Kasai M., Suzuki J., Kuroyama H., Seki S., Utsuyama M., Hirokawa K.: Multimerization of the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 47217–47222



- [24] Khosla S.: Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 2001; 142: 5050–5055
- [25] Kiechl S., Schett G., Wenning G., Redlich K., Oberhollenzer M., Mayr A., Santer P., Smolen J., Poewe W., Willeit J.: Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation*, 2004; 109: 2175–2180
- [26] Kitagawa Y., Dai J., Zhang J., Keller J.M., Nor J., Yao Z., Keller E.T.: Vascular endothelial growth factor contributes to prostate cancer – mediated osteoblastic activity. *Cancer Res.*, 2005; 65: 10921–10929
- [27] Kmieć Z., Sokółowska I.: Rola cytokin z rodziny czynnika martwicy nowotworu w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów: nowe możliwości terapii. *Pol. Merk. Lek.*, 2007; 22: 300–304
- [28] Kominsky S.L., Abdelmagid S.M., Doucet M., Brady K., Weber K.L.: Macrophage inflammatory protein-1 $\delta$ : a novel osteoclast stimulating factor secreted by renal cell carcinoma bone metastasis. *Cancer Res.*, 2008; 68: 1261–1266
- [29] Krishnan V., Bryant H.U., MacDougald O.A.: Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 1202–1209
- [30] Lamoureux F., Richard P., Wittrant Y., Battaglia S., Pilet P., Trichet V., Blanchard F., Gouin F., Pitard B., Heymann D., Redini F.: Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.*, 2007; 67: 7308–7318
- [31] Lee H.W., Park H.K., Na Y.J., Kim C.D., Lee J.H., Kim B.S., Kim J.B., Lee C.W., Moon J.O., Yoon S.: RANKL stimulates proliferation, adhesion and IL-7 expression of thymic epithelial cells. *Exp. Mol. Med.*, 2008; 40: 59–70
- [32] Lee Y.P., Schwarz E.M., Davies M., Jo M., Gates J., Zhang X., Wu J., Lieberman J.R.: Use of zoledronate to treat osteoblastic versus osteolytic lesions in a severe-combined-immunodeficient mouse model. *Cancer Res.*, 2002; 62: 5564–5570
- [33] Lerner U.H.: New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2004; 15: 64–81
- [34] Loberg R.D., Logothetis C.J., Keller E.T., Pienta K.J.: Pathogenesis and treatment of prostate cancer bone metastases: targeting the lethal phenotype. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 8232–8241
- [35] Logothetis C.J., Lin S.H.: Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 21–28
- [36] Manolagas S.C.: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.*, 2000; 21: 115–137
- [37] McClung M.: Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9 (Suppl.1): S3
- [38] Min J.K., Kim Y.M., Kim Y.M., Kim E.C., Gho Y.S., Kang I.J., Lee S.Y., Kong Y.Y., Kwon Y.G.: Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 39548–39557
- [39] Mori K., Le Goff B., Charrier C., Battaglia S., Heymann D., Rédini F.: DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NF $\kappa$ B: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. *Bone*, 2007; 40: 981–990
- [40] Morrissey C., Kostenuik P.L., Brown L.G., Vessella R.L., Corey E.: Host-derived RANKL is responsible for osteolysis in a C4-2 human prostate cancer xenograft model of experimental bone metastases. *BMC Cancer*, 2007; 7: 148
- [41] Mundy G.R.: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 584–593
- [42] Oshima T., Abe M., Asano J., Hara T., Kitazoe K., Sekimoto E., Tanaka Y., Shibata H., Hashimoto T., Ozaki S., Kido S., Inoue D., Matsumoto T.: Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood*, 2005; 106: 3160–3165
- [43] Oyajobi B.O.: Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9 (Suppl.1): S4
- [44] Pan B., Farrugia A.N., To L.B., Findlay D.M., Green J., Lynch K., Zannettino A.C.: The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE). *J. Bone Miner. Res.*, 2004; 19: 147–154
- [45] Park H.R., Min S.K., Cho H.D., Kim D.H., Shin H.S., Park Y.E.: Expression of osteoprotegerin and RANK ligand in breast cancer bone metastasis. *J. Korean Med. Sci.*, 2003; 18: 541–546
- [46] Pearce R.N., Sordillo E.M., Yaccoby S., Wong B.R., Liao D.F., Colman N., Michaeli J., Epstein J., Choi Y.: Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 11581–11586
- [47] Riggs B.L., Parfitt A.M.: Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J. Bone Miner. Res.*, 2005; 20: 177–184
- [48] Rogers A., Eastell R.: Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005; 90: 6323–6331
- [49] Roodman G.D.: Regulation of osteoclast differentiation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006; 1068: 100–109
- [50] Roodman G.D.: Novel targets for myeloma bone disease. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2008; 12: 1377–1387
- [51] Schett G.: Erosive arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9 (Suppl.1): S2
- [52] Schneider A., Kalikin L.M., Mattos A.C., Keller E.T., Allen M.J., Pienta K.J., McCauley L.K.: Bone turnover mediates preferential localization of prostate cancer in the skeleton. *Endocrinology*, 2005; 146: 1727–1736
- [53] Schoppet M., Preissner K.T., Hofbauer L.C.: RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002; 22: 549–553
- [54] Schwarz E.M., Ritchlin C.T.: Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9 (Suppl.1): S7
- [55] Seidel C., Hjertner  $\emptyset$ ., Abildgaard N., Heickendorff L., Hjorth M., Westin J., Nielsen J.L., Hjorth-Hansen H., Waage A., Sundan A., Børset M.: Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood*, 2001; 98: 2269–2271
- [56] Shoback D.: Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2007; 92: 747–753
- [57] Standal T., Børset M., Lenhoff S., Wisloff F., Stordal B., Sundan A., Waage A., Seidel C.: Serum insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. *Blood*, 2002; 100: 3925–3929
- [58] Standal T., Seidel C., Hjertner  $\emptyset$ ., Plesner T., Sanderson R.D., Waage A., Børset M., Sundan A.: Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*, 2002; 100: 3002–3007
- [59] Suzuki J., Ikeda T., Kuroyama H., Seki S., Kasai M., Utsuyama M., Tatsumi M., Uematsu H., Hirokawa K.: Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 314: 1021–1027
- [60] Tanaka S., Nakamura K., Takahashi N., Suda T.: Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunol. Rev.*, 2005; 208: 30–49
- [61] Tanaka Y., Nakayama S., Okada Y.: Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 2005; 4: 325–328
- [62] Terpos E., Dimopoulos M.A.: Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Ann. Oncol.*, 2005; 16: 1223–1231
- [63] Theoleyre S., Wittrant Y., Tat S.K., Fortun Y., Redini F., Heymann D.: The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2004; 15: 457–475
- [64] Thomas R.J., Guise T.A., Yin J.J., Elliott J., Horwood N.J., Martin T.J., Gillespie M.T.: Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology*, 1999; 140: 4451–4458
- [65] Virk M.S., Lieberman J.R.: Tumor metastasis to bone. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9 (Suppl.1): S5
- [66] Wada T., Nakashima T., Hiroshi N., Penninger J.M.: RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol. Med.*, 2006; 12: 17–25
- [67] Wittrant Y., Theoleyre S., Chipoy C., Padrines M., Blanchard F., Heymann D., Rédini F.: RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004; 1704: 49–57
- [68] Yoneda T., Hiraga T.: Crosstalk between cancer cells and bone micro-environment in bone metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 328: 679–687
- [69] Zheng Y., Zhou H., Brennan K., Blair J.M., Modzelewski J.R., Seibel M.J., Dunstan C.R.: Inhibition of bone resorption, rather than direct cytotoxicity, mediates the anti-tumour actions of ibandronate and osteoprotegerin in a murine model of breast cancer bone metastasis. *Bone*, 2007; 40: 471–478