



## Ocena zależności między odsetkiem preosteoklastów w szpiku i krwi obwodowej a markerami aktywności u chorych na szpiczaka plazmocytozy

Dariusz Jawniak<sup>1</sup>, Magdalena Górka<sup>1</sup>, Aneta Gorący<sup>1</sup>, Magdalena Wróbel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku AM, ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin, <sup>2</sup>Magistrantka V roku Wydziału Farmaceutycznego, Oddziału Analityki AM w Lublinie

Rep Pract Oncol Radiother 2004;9:243-7, original paper

Received March 31<sup>st</sup>, 2004; received in a revised form May 31<sup>st</sup>, 2004; accepted June 21<sup>st</sup>, 2004

### Streszczenie

**Wstęp:** Szpiczak plazmocytozy jest chorobą proliferacyjną o złożonej patogenecie, na którą składa się kompartment komórek szpiczakowych tworzących tzw. „masę guza” oraz komórki osteoklastyczne z ich prekursorami tworzących komponent „kostny” choroby. Oba procesy chorobowe są powiązane przez wpływy cytokin i wzajemne oddziaływanie komórek mimo to często w obrazie klinicznym widywane są dysproporcje w ich nasileniu. Celem pracy była cytofluorymetryczna identyfikacja prekursorów osteoklastów we krwi obwodowej i w szpiku u chorych na szpiczaka mnogiego, a także zbadanie wzajemnych zależności pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami komórek jednojądrzastych we krwi i w szpiku oraz odniesienie uzyskanych wyników do przebiegu klinicznego choroby, a w szczególności destrukcji układu kostnego.

**Materiał i metoda:** Badania immunofenotypowe przeprowadzono w grupie 14 wcześniej nieleczonych chorych na szpiczaka mnogiego za pomocą trójkolorowego cytometru przepływowego FACS Calibur.

**Wyniki:** Odsetek komórek nowotworowych w szpiku wahał się w granicach 8.1-21.3 (śr. 13.8±6.12), natomiast we krwi wynosił odpowiednio 0.1-3.6 (śr. 0.45±0.94). Odsetek prekursorów osteoklastów w szpiku wynosił 0.955±0.572, a we krwi 0.454±0.972. Zanotowano obecność ujemnej korelacji między odsetkiem preosteoklastów w szpiku a parametrami układu czerwonych krwinek oraz liczbą płytek krwi. Jednocześnie stwierdzono dodatnią korelację między odsetkiem preosteoklastów we krwi a „masą guza” ocenianą na podstawie odsetka plazmocytozy.

**Wnioski:** Immunologiczne cechy aktywności szpiczaka mnogiego odpowiadają aktywności choroby i korelują z wielkością kompartmentu preosteoklastów. Duży odsetek preosteoklastów krążących we krwi wiąże się z małym zaawansowaniem zmian kostnych, co sugeruje mniejszą liczbę dojrzałych osteoklastów bezpośrednio zaangażowanych w destrukcję kostną.

**Słowa kluczowe:** szpiczak mnogi, preosteoklasty, plazmocyty, CD138.

## The evaluation of the relationship between the percentage of preosteoclasts in the bone marrow or peripheral blood and activity markers in multiple myeloma patients

### Summary

**Introduction:** Multiple myeloma is a myeloproliferative disease of complex pathogenesis which is represented by a plasma cells compartment developing into the so-called tumour mass as well as osteoclast cells together with their initial forms, precursors, affecting the skeletal system. Both disease processes are closely related with each other through the influence of cytokines and interactions among plasma cells, osteoclasts and bone marrow stromal cells. Nevertheless, there is often a disproportion between the bone disease and proliferation of plasma cells. The aim of this study was to identify the precursors of osteoclasts by cytofluorimetry in the blood and bone marrow samples from patients with multiple myeloma. We also analyzed the dependence between subpopulations of mononuclear cells in the blood and bone marrow. We tried to refer our results to the development of the disease and destruction of the skeletal system.

**Materials and methods:** An immunophenotype analysis was carried out on cells of 14 patients with de novo multiple myeloma by a three-colour cytofluorimetry FACS Calibur.

**Results:** The percentage of neoplastic cells in the bone marrow was 8.1-21.3 (average 13.8±6.12) whereas that in the blood was

0.1-3.6 (average  $0.45 \pm 0.94$ ). The percentage of precursors of osteoclasts in the bone marrow was  $0.955 \pm 0.572$  whereas that in the blood was  $0.454 \pm 0.972$ . Our analysis showed a negative correlation between the percentage of preosteoclasts in the bone marrow and the parameters of the erythrocytic system and the number of platelets. We also noticed a positive correlation between the percentage of preosteoclasts in the blood and the percentage of plasma cells in the bone marrow.

**Conclusions:** Immunological markers of multiple myeloma activity correspond to the disease activity and correlate with the number of preosteoclasts. A high percentage of preosteoclasts in the blood is connected with a low destruction of bones which suggests that a fewer number of osteoclasts destroy the skeletal system.

**Key words:** multiple myeloma, preosteoclasts, plasma cells, Cd138.

## Wstęp

Szpiczak mnogi SzM (Multiple Myeloma MM) należy do proliferacyjnych chorób układu chłonnego. Jednak z powodu odmiennego przebiegu i symptomatologii związanej z patologią układu kostnego został z tej grupy chorób wyłączony. Jest jednym z najczęściej obserwowanych nowotworów szpiku i kości. U podłoża zmian patogenetycznych leży istnienie klonu monoklonalnych komórek o morfologii plazmocyta, wydzielających do krwi białka, zwane immunoglobulinami monoklonalnymi. Ich stężenie we krwi w przybliżeniu koreluje z rozprzestrzenieniem procesu chorobowego [1]. Stałymi objawami klinicznymi tej choroby są bóle kostne obejmujące głównie kości płaskie takie jak żebra, kręgosłup, kości miednicy. Stały ból może być spowodowany patologicznym złamaniem wymienionych wyżej kości. Przyczyną zmian kostnych jest proliferacja komórek nowotworowych oraz wzmożona aktywność osteoklastów, wywołana wydzielanymi przez plazmocyty cytokinami takimi jak: IL-1, TNF, znane jako czynniki aktywujące osteoklasty (OAF) [2]. Najczęstszymi zmianami są ogniska osteolityczne; rzadko widywane są ogniska osteoblastycznego nowotworzenia. Destrukcja kości jest przyczyną uwalniania wapnia z tkanki kostnej i wzrostu stężenia tego jonu w surowicy [3].

Osteoklasty są komórkami pochodzenia szpikowego. Na podstawie licznych badań autorzy są zgodni, że źródłem osteoklastów jest tkanka hemopoetyczna szpiku [4]. Zaproponowano istnienie trzech faz w różnicowaniu się osteoklastów na podstawie danych uzyskanych przy użyciu cytometrii przepływowej i metody *Northem blot* [5]. Są to:

- *pro-osteoklasty (pro-OC)* - w hodowli mają kształt wrzecionowaty, wykazują silną ekspresję genu dla osteopontyny (OPN) i brak ekspresji genów dla CTR (receptor dla kalcytoniny), CAII (anhydraza węglanowa II), cath K (katepsyna K), MMP9 (metaloproteinaza 9) i TRAP (winiianoopoma fosfataza kwaśna); odpowiadają M-CSF - zależnym makrofagom szpiku kostnego tj. MDBM (M-CSF - *macrophage colony stimulating factor*);
- *pre-osteoklasty (pre-OC)* - są małymi okrągłymi jednojądrzastymi komórkami, które wykazują ekspresję prawie wszystkich markerów osteoklastów, natomiast pozbawione są fenotypu charakterystycznego dla makrofagów;

- *dojrzałe osteoklasty (mature OC)* - wielojądrowe komórki mające silną ekspresję genów znacznikowych osteoklastów: CTR, CAII, cath K, MMP9 i TRAP.

Podczas hodowli *in vitro* MDBM (TRAP-) ulegają efektywnemu różnicowaniu do osteoklastów (TRAP+) w obecności rozpuszczalnego RANKL (ligand dla aktywatora czynnika jądrowego  $\beta$ ) i M-CSF [6, 7]. Dopiero dojrzałe osteoklasty mają wysoce specyficzny fenotyp, zarówno pod względem antygenowym jak i cytochemicznym, natomiast poszczególne ich formy rozwojowe wykazują różną ekspresję tych samych antygenów znacznikowych. Pro- i preosteoklasty wykazują ekspresję antygenów: CD14, CD11a, CD11b i HLA-DR [4]. Z kolei antygen CD38 jest obecny na preosteoklastach i osteoklastach, co można zaobserwować przy użyciu hybrydyzacji *in situ* w 8 dniu hodowli. Jednocześnie komórki te są wówczas CD19-. Antygen CD14 jest obecny tylko na preosteoklastach [8].

Osteoklasty wyizolowane od pacjentów ze SzM mają słabo zaznaczoną ekspresję CD54 i CD56, rozległą powierzchniową ekspresję integryny  $\beta_1$  oraz ekspresję integryny  $\beta_3$  zlokalizowaną wewnątrz komórki. Natomiast osteoklasty pochodzące od zdrowych dawców nie wykazują ekspresji antygenów: CD54 i CD56 [5,9].

Celem pracy była cytofluorymetryczna identyfikacja prekursorów osteoklastów we krwi obwodowej i w szpiku u chorych na szpiczaka mnogiego, a także zbadanie wzajemnych zależności pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami komórek jednojądrzastych we krwi i w szpiku oraz odniesienie uzyskanych wyników do przebiegu klinicznego choroby, a w szczególności destrukcji układu kostnego.

## Materiał i metoda

Badania przeprowadzono w Klinice Hematologii Akademii Medycznej w Lublinie. Przedmiotem badań objęto 14 chorych, wcześniej nieleczonych, u których rozpoznano szpiczaka mnogiego.

Grupa chorych składała się z 11 kobiet i 3 mężczyzn. Wiek w całej grupie wahał się od 43 do 81 lat (śr.  $60.7 \pm 11.7$ ). U jednego chorego (7.14%) stwierdzono I stadium zaawansowania, u trzech pacjentów (21.42%) rozpoznano II stadium, natomiast u 10 chorych (71.43%) III stadium. Zmiany kostne określano na podstawie kryteriów Case'go. U czterech chorych (28.57%) stwierdzono zaawansowane zmiany

destrukcyjne układu kostnego (stadium 3), u kolejnych czterech pacjentów (28.57%) rozpoznano umiarkowane zmiany osteolityczne (stadium 2), również u czterech chorych (28.57%) stwierdzono osteoporozę (stadium I); natomiast zmian kostnych nie stwierdzono (stadium 0) u dwóch pacjentów (14.28%).

Najczęściej obserwowano postać szpiczaka mnogiego z obecnością białka monoklonalnego typu IgG, bo u siedmiu chorych (50.0%), w trzech przypadkach (21.42%) rozpoznano szpiczaka klasy IgA, natomiast u czterech chorych (28.57%) stwierdzono postać poronną. Odsetek plazmacytów w szpiku wynosił od 3 do 64% (śr.  $25.4 \pm 27.4\%$ ). Stężenie wapnia całkowitego w surowicy krwi wahało się od 2.3 do 7.2 mEq/l ( $4.8 \pm 1.05$  mEq/l), natomiast aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) wynosiła od 1.7 do 304.0 U/l (śr.  $178.2 \pm 80.2$  U/l).

Materiałem do badań była krew obwodowa oraz szpik kostny pobrany metodą biopsji aspiracyjnej mostka lub trepanobiopsji talerza kości biodrowej. Do badań immunofenotypowych izolowano komórki jednojądrzaste. Świeżo pobrany szpik kostny i krew rozcieńczano buforowanym roztworem 0.9% NaCl (PBS) w stosunku 5:1 i po nawarstwieniu na roztwór Gradisolu L (Polskie Artykuły Medyczne „Aqua-Medica”). Wirowano przez 20 min. w temp. 20°C przy 3 tys. obrotów/minutę. Zawiesinę komórek płukano roztworem PBS-u i rozdzielano po ok.  $10^6$  komórek (100  $\mu$ l) na probówkę oraz dodawano po 50  $\mu$ l rozcieńczonego lub 5  $\mu$ l stężonego przeciwciała monoklonalnego. Inkubację przeprowadzano w temp. 4°C w czasie 30 min. Ekspresję cząsteczek adhezyjnych na komórkach jednojądrzastych aspi-

## Wyniki

Dzięki zastosowaniu cytometrii przepływowej stało się możliwe oznaczenie ekspresji antygenów CD138+/CD51+/CD14+ charakteryzujące komórki preosteoklastyczne zarówno w szpiku, jak i we krwi u chorych ze szpiczakiem mnogim. Ponadto stwierdzono obecność komórek o fenotypie CD138+/CD38+++ /CD45-, które odpowiadają monoklonalnym komórkom plazmatycznym.

### Ocena immunofenotypu prekursorów osteoklastów

Odsetek komórek z ekspresją antygenów Cd138+/CD51+/CD14+ w szpiku wahał się pomiędzy 0.29-1.83 (śr.  $0.955 \pm 0.572$ ), natomiast we krwi wynosił od 0.06 do 3.64 (śr.  $0.454 \pm 0.972$ ). Stwierdzono istnienie ujemnej korelacji między ekspresją wyżej wymienionych antygenów na komórkach jednojądrzastych w szpiku a stężeniem hemoglobiny we krwi. Zaobserwowano również obecność ujemnej korelacji między odsetkiem prekursorów osteoklastów w szpiku a liczbą płytek krwi. Na podstawie analizy statystycznej, stwierdzono także istnienie ujemnej korelacji pomiędzy ekspresją antygenów CD138+/CD51+/CD14+ w szpiku, jak i we krwi a wielkością białkomoczu. Ważną zależnością jest istnienie dodatniej korelacji między odsetkiem komórek z ekspresją antygenów CD138+/CD51+/CD14+ we krwi a odsetkiem plazmacytów w badaniu cytologicznym szpiku jak również odsetkiem plazmacytów w badaniu cytofluorymetrycznym. W Tabeli 1 zostały zestawione uzyskane istotne statystycznie korelacje.

**Tabela 1.** Korelacje między odsetkiem prekursorowych komórek osteoklastycznych (CD138+/CD51+/CD14+) w szpiku i krwi a ocenianymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi.

**Table 1.** Correlations between the percentage of preosteoclasts in the bone marrow and the peripheral blood (CD138+/CD51+/CD14+) and evaluated parameters.

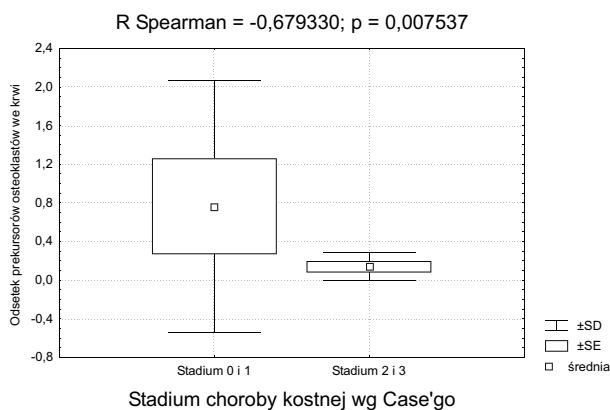
korelowane parametry	R Spearman	poziom istotności p
CD138+/CD51+/CD14+ (szpik) i stężenie HGB	-0.643581	0.017623
CD138+/CD51+/CD14+ (szpik) i liczba PLT	-0.638240	0.001083
CD138+/CD51+/CD14+ (szpik) i odsetek plazmacytów w szpiku	0.637456	0.034875
CD138+/CD51+/CD14+ (szpik) i białkomocz	-0.759072	0.010892
CD138+/CD51+/CD14+ (krew) i białkomocz	-0.832545	0.002796

ratu szpiku oznaczano metodą bezpośredniego barwienia przy użyciu przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) lub fikoerytryną (PE) oraz PerCP. Odczyt wyników dokonywano przy użyciu trójkolorowego cytometru przepływowego FACSCalibur firmy BECTON DICKINSON SYSTEMS. W każdej próbówce oceniano od 7 000 do 10 000 komórek. Za wynik dodatni, świadczący o obecności antygeny uważano stwierdzenie jej ekspresji przynajmniej na 30% komórek.

Grupa badanych chorych została podzielona na dwie podgrupy, biorąc pod uwagę zaawansowanie choroby kostnej wg Case'go. W grupie chorych z mało aktywną chorobą kostną w przebiegu szpiczaka mnogiego, (stadium 0 i 1 wg Case'go) zaobserwowano statystycznie istotny większy odsetek prekursorowych komórek osteoklastycznych o fenotypie CD138+/CD51+/CD14+ we krwi obwodowej. Natomiast w szpiku chorych z zaawansowaną chorobą kostną stwierdzono większy odsetek komórek o immunofeno-

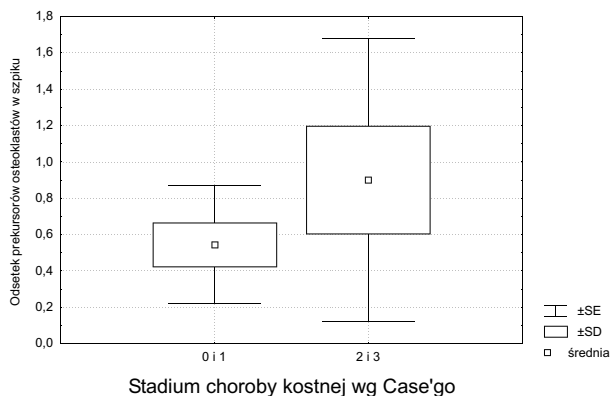
typie CD138+/CD51+/CD14+, charakteryzowanych jako preosteoklasty. Nie była to jednak zależność statystycznie istotna (RSpearman 0.459899,  $p=0.098$ ).

Na Rycinach 1 i 2 został przedstawiony odsetek preosteoklastów we krwi i szpiku u chorych podzielonych na dwie grupy w zależności od zaawansowania choroby kostnej.



**Rycina 1.** Odsetek komórek preosteoklastycznych (C138+/CD51+/CD14+) we krwi obwodowej w zależności od stopnia zaawansowania choroby kostnej wg Case'go.

**Figure 1.** The percentage of preosteoclasts (C138+/CD51+/CD14+) in the peripheral blood depending on skeletal destruction according Case.



**Rycina 2.** Odsetek komórek preosteoklastycznych (C138+/CD51+/CD14+) w szpiku w zależności od stopnia zaawansowania choroby kostnej wg Case'go.

**Figure 2.** The percentage of preosteoclasts (C138+/CD51+/CD14+) in the bone marrow depending on skeletal destruction according Case.

### Ocena immunofenotypu monoklonalnych komórek plazmatycznych

Odsetek komórek charakteryzujących się fenotypem: CD138+/CD38+++ /CD45- w szpiku wahał się pomiędzy 0.46 - 21.34 (śr.  $8.034 \pm 6.126$ ), natomiast we krwi wyniósł od 0.01 do 3.60 (śr.  $0.452 \pm 0.948$ ). Zawartość komórek szpiczakowych identyfikowanych w cytometrze przepływowym w sposób istotny wiązała się z podstawowymi parametrami

morfologii krwi obwodowej. Stwierdzono, bowiem ujemną korelację między odsetkiem tych komórek i to zarówno w szpiku, jak i we krwi a stężeniem hemoglobiny i liczbą erytrocytów we krwi chorych. Zaobserwowano również istnienie ujemnej korelacji pomiędzy odsetkiem komórek plazmatycznych w szpiku a liczbą płytek krwi. Jedną z ważniejszych zależności jest obecność dodatniej korelacji pomiędzy odsetkiem komórek plazmatycznych o fenotypie CD138+/CD38+++ /CD45- we krwi a stężeniem beta2-mikroglobuliny w surowicy (R Spearman 0.750000,  $p=0.05001$ ).

### Dyskusja

Szpiczak mnogi jest chorobą nowotworową, w przebiegu, której dochodzi do wzmożonej aktywności procesów resorpcji i odbudowy kości, jednak ze znaczną przewagą tego pierwszego. Główną kliniczną manifestacją zmian u tych pacjentów jest osteoliza w postaci rozległego niszczenia kości. Za proces ten odpowiada generacja aktywowanych osteoklastów obecnych w mikrośrodkowisku szpiku kostnego [10]. Dojrzałe osteoklasty są dużymi wielojądrowymi komórkami, które powstają w wyniku fuzji krążących, jednojądrowych komórek prekursorowych wywodzących się z wielopotencjalnej hematopoetycznej komórki macierzystej szpiku [11]. Na proces rekrutacji prekursorów osteoklastów i ich fuzji w wielojądrzaste osteoklasty mają wpływ zarówno hormony osteotropowe, jak i działające miejscowo cytokiny [11]. Na podstawie licznych badań autorzy są zgodni, że komórki te należą do linii monocyt/makrofag i że M-CSF jest kluczowym mediatorem odpowiedzialnym za proliferację i różnicowanie się prekursorów osteoklastów a także za prawidłową aktywność dojrzałych osteoklastów [12,13]. Mimo ciągle prowadzonych prac, dokładna charakterystyka prekursorów osteoklastów nie została w pełni poznana. Badania ekspresji komórek preosteoklastycznych we krwi obwodowej i w szpiku i ich roli w przebiegu procesu chorobowego u pacjentów ze szpiczakiem mnogim, dostarczają nowych informacji, a także pozwalają na lepsze zrozumienie patofizjologii tej choroby. Gregoretti i wsp. [10] obserwowali resorpcję kostną *in vitro* spowodowaną przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej pobranych od chorych na szpiczaka plazmatycznego z zaawansowaną chorobą kostną (stadium 2 i 3 wg Case'go). Natomiast nie stwierdzono osteolizy dokonanej przez komórki krwi obwodowej pobranych od chorych na monoklonalną gammopatię o nieokreślonym znaczeniu (MGUS - monoclonal gammopathy of undetermined significance) oraz od chorych z mało zaawansowaną chorobą kostną w przebiegu szpiczaka (stadium 0 i 1 wg Case'go). Populacja komórek jednojądrzastych od pacjentów z zaawansowaną chorobą kostną (stadium 2,3 wg Case'go) transformowała do wielojądrzastych komórek z morfologią i fenotypem osteoklastów. Pozwoliło to sformułować wyżej wymienionym autorom wniosek, iż chorzy z daleko posu-

niętym procesem osteolitycznym w przebiegu szpiczaka mnogiego mają liczną populację krążących prekursorów we krwi obwodowej, które w wyniku kontaktu z mikrośrodowiskiem szpiku kostnego rozwijają się do funkcjonalnie aktywnych osteoklastów. Te komórki przyczyniają się do rozprzestrzeniania się erozji kostnej obserwowanej u pacjentów. W materiale własnym obserwowano odwrotną zależność. U chorych w stadium 0 i 1 wg Case'go odsetek komórek CD138+/CD51+/CD14+, odpowiadających preosteoklastom we krwi był najwyższy spośród wszystkich badanych chorych, co mogłoby wskazywać na sekwestrację tych komórek we krwi i brak prostej zależności między odsetkiem preosteoklastów w szpiku i krwi obwodowej. Największy natomiast odsetek prekursorów osteoklastów oraz komórek szpiczakowych w szpiku stwierdzono w szpiku chorych z bardzo zaawansowaną chorobą kostną. Brak istotności statystycznej należy wiązać z małą liczebnością grupy badanej. Podobne obserwacje poczynili Heider i wsp. którzy badali związek między liczebnością populacji komórek o fenotypie CD38++/CD138+ w szpiku chorych na szpiczaka mnogiego i zaawansowaniem zmian kostnych [14]. W materiale własnym odsetek populacji preosteoklastów korelował także z biochemicznymi wskaźnikami aktywności choroby tzn. stężeniem beta2-mikroglobuliny, stężeniem hemoglobiny, liczbą płytek we krwi oraz wielkością populacji komórek szpiczakowych w szpiku. Wskazuje to na złożoność proliferacji szpiczakowej, w patogenezie której bierze udział kompartment komórek szpiczakowych tworzących tzw. „masę guza” oraz komórki osteoklastyczne z ich prekursorami tworzących komponent „kostny” choroby. Wprawdzie w klinice nie zawsze obie „choroby” są wprost proporcjonalnie reprezentowane, co może wynikać z niedoskonałych a jednocześnie najbardziej dostępnych metod radiologicznych badania kośćca.

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że immunologiczne cechy aktywności szpiczaka mnogiego odpowiadają klinicznym wykładnikom aktywności choroby oraz korelują z wielkością kompartmentu prekursorowych komórek osteoklastycznych. Jednocześnie duży odsetek preosteoklastów krążących we krwi wiąże się z małym zaawansowaniem zmian kostnych, co może sugerować mniejszą liczbę i/lub aktywność dojrzałych osteoklastów bezpośrednio zaangażowanych w destrukcję kostną.

## Piśmiennictwo

1. Drach J, Kaufmann H, Urbauer E, Schreiber S, Ackermann J, Heinz H. The biology of multiple myeloma. *J Cancer Clin Oncol* 2000;126:441-7.
2. Bataille R. The Mechanisms of Bone Lesion in Human Plasmacytomas. *Stem Cell* 1995;13:40-7.
3. Kanis JA, McCloskey EV. Bone Turnover and Biochemical Markers in Malignancy. *Cancer* 1997;80:1538-45.
4. Fujikawa Y, Quinn JM, Sabokbar A, McGee JO, Athanasou NA. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology* 1996;137:4058-60.
5. Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2000;15:1477-88.
6. Purton LE, Minako LY, Torok-Starb B. Normal Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Mobilized with Granulocyte Colony-Stimulating Factor Have Increased Osteoclastogenic Potential Compared To Nonmobilized Blood. *Blood* 1996;87:1802-08.
7. Stejskal D, Bartek J, Pastorkove R, Oral L, Koralik D. Osteoprotegerin, RANKL, RANK. *Biomed. Papers* 2001;145:61-4.
8. Faust J, Hunt P, Scully S, Shalhoub V. Multiple Myeloma Cells and Cells of the Human Osteoclast Lineage Share Morphological and Cell Surface Markers. *J Cell Biochem* 1998;71:559-68.
9. Gregoretti MG, Gottardi D, Ghia P, Bergui L, Merico F, Marchisio PC, et al. Characterization of bone marrow stromal cells from multiple myeloma. *Leukemia Res* 1994;18:675-82.
10. Gregoretti MG, Bergui L, Aragno M, Cremona O, Marchisio PC, Calligaris-Cappio F. Osteoclast precursors circulate in the peripheral blood of patients with aggressive multiple myeloma. *Leukemia* 1995;9:1392-97.
11. Scheven BA, Visser JW, Nijwiede P. In vitro osteoclast generation from different marrow fractions including highly enriched haemopoietic stromal cell population. *Nature* 1996;321:79.
12. Kodama H, Nose M, Niida S, Yamasahi A. Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoblast differentiation supported by stroma cells. *J Exp Med* 1991;173:1291-94.
13. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993;91:257-63.
14. Heider U, Langelotz C, Jakob C, Zavrski I, Fleissner C, Eucker J, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1436-40.

