

Ocena stężenia osteoprotegeryny i wybranych markerów stanu zapalnego u pacjentów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym

Evaluation of osteoprotegerin level and selected inflammatory markers in patients with essential hypertension

Summary

Background Recent studies suggest that serum osteoprotegerin (OPG) levels increase in association with coronary artery calcification, coronary artery disease, stroke and future cardiovascular events. The aim of this study was to determine serum OPG levels and to investigate the relationship between OPG and selected inflammatory markers in hypertensive patients.

Material and methods Thirty patients with hypertension were studied. As a control 10 healthy volunteers were used. Physical examination was performed. Plasma OPG concentrations (OPG, enzyme-linked immunosorbent assay), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP, turbidimetry method) and tumor necrosis factor α (TNF- α , radioimmunoassay) were determined.

Results The levels of plasma OPG, hsCRP and TNF- α significantly exceeded those observed in the control group ($p < 0.05$). Positive correlation between OPG and TNF- α ($p < 0.05$) was found.

Conclusions Hypertension is characterized by increased inflammatory process. The association of elevated OPG with TNF- α may provide a mechanistic link between coro-

nary artery calcification, atherosclerosis progression and inflammation in this group of patients.

key words: arterial hypertension, osteoprotegerin, tumor necrosis factor, atherosclerosis

Arterial Hypertension 2010, vol. 14, no 5, pages 375–380.

Wstęp

W ostatnich latach coraz większe znaczenie w patogenezie nadciśnienia tętniczego oraz miażdżycy przypisuje się procesom immunologicznym i zapalnym. W badaniach klinicznych u chorych obciążonych ryzykiem miażdżycy wykazano podwyższone stężenia wykładników zapalenia, takich jak: fibrynogen, białko C-reaktywne (CRP, *C-reactive protein*), czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α , *tumor necrosis factor- α*), interleukiny oraz amyloid osoczowy [1–3]. Uszkodzenie śródbłonna prowadzi do przechodzenia monocytów pod śródbłonek naczyń i ich przekształcenia w makrofagi, a następnie komórki piankowe zawierające cholesterol oraz do rozrostu komórek mięśni gładkich w błonie wewnętrznej tętnicy. Na tym właśnie etapie rozwoju blaszki miażdżycowej istotną rolę odgrywają wyżej wspomniane czynniki prozapalne, które stymulują ogniskowe wapnienie w blaszce miażdżycowej,

Adres do korespondencji: dr n. med. Paweł Bogdański
Klinika Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia
Tętniczego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego
ul. Szamarzewskiego 84, 60–569 Poznań
tel.: (61) 854 93 78, faks: (61) 847 85 29
e-mail: pawelbogdanski@wp.pl



Copyright © 2010 Via Medica, ISSN 1428–5851

w wyniku czego ściana tętnic staje się twarda i krucha. Zjawisko kalcyfikacji oraz częste współwystępowanie osteoporozy i chorób układu sercowo-naczyniowego, szczególnie u kobiet po menopauzie, skierowało uwagę na poszukiwanie związku patologii kości z patologią chorób układu sercowo-naczyniowego [4–10]. Najnowsze odkrycia sugerują, że istnieją szlaki, które warunkują metabolizm kości, a zarazem przemiany błony mięśniowej naczyń krwionośnych. Odkrycie w 1997 roku glikoproteiny o nazwie osteoprotegeryna (OPG, *osteoprotegerin*) i potwierdzenie jej kluczowej roli w metabolizmie kości ugruntowało nowe spojrzenie na ten problem [11]. Wyniki doświadczeń na myszach wykazały, że pozabawienie osobnika ekspresji OPG skutkuje nie tylko osteoporozą, ale również odkładaniem depozytów wapnia w warstwie mięśniowej naczyń krwionośnych, sugerując tym samym protekcyjną i przeciwmiażdżycową rolę tej glikoproteiny [12, 13]. Jednak w badaniach klinicznych stwierdzono dodatnią korelację stężenia OPG w surowicy z kalcyfikacją naczyń, chorobą wieńcową, zawałem serca czy ryzykiem sercowo-naczyniowym. Skłoniło to do rozważań nad potencjalnym znaczeniem OPG jako biomarkera w chorobach układu sercowo-naczyniowego i do poszukiwań dokładnego mechanizmu działania tego białka. W świetle najnowszych danych OPG pozostaje nie tylko wskaźnikiem, ale również mediatorem patologii naczyń, modulującym osteogenezę, odpowiedź zapalną i apoptozę.

Celem pracy było oznaczenie stężenia OPG i poszukiwanie związku między OPG i wybranymi markerami stanu zapalnego u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym.

Materiał i metody

W badaniu uczestniczyło 30 pacjentów Poradni Nadciśnienia Tętniczego przy Klinice Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Bezwzględny warunkiem udziału chorego w badaniu było udzielenie pisemnej, świadomej zgody na to.

W chwili włączenia do badania pacjent musiał spełniać następujące kryteria:

1. Zdiagnozowane samoistne nadciśnienie tętnicze definiowane zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego.

2. Nieprzyjmowanie leków hipotensyjnych (do badania włączano chorych z niedawno rozpoznany nadciśnieniem tętniczym lub pacjentów niewymagających farmakoterapii).

3. Stabilna masa ciała (± 1 kg) w miesiącu poprzedzającym badanie.

4. Wiek 18–65 lat.

Kryteria wykluczenia, na podstawie pełnego badania klinicznego, badań laboratoryjnych i wybranych badań obrazowych, obejmowały występowanie: nadciśnienia wtórnego, niewydolności serca, choroby niedokrwiennej serca, choroby naczyń obwodowych (tętnic szyjnych, kręgowych lub tętnic kończyn dolnych), zaburzonej funkcji nerek (stężenie kreatyniny w osoczu $> 115 \mu\text{mol/l}$), zaburzonej funkcji wątroby (wartości transaminaz 2,5-krotnie przekraczające zakresy norm), cukrzycy lub zaburzonej tolerancji glukozy, ostrego albo przewlekłego, klinicznie jawnego procesu zapalnego (chorób tkanki łącznej i stawów, procesów zapalnych dróg oddechowych, procesów zapalnych układu moczowo-płciowego, procesu zapalnego w obrębie głowy i szyi), infekcji w ostatnim miesiącu.

Grupę kontrolną stanowiło 10 zdrowych ochotników, porównywalnych z grupą badaną pod względem płci i wieku. Charakterystykę badanych grup przedstawiono w tabeli I.

W obu badanych grupach w dniu pobrania krwi, około godziny 8.00 rano, 12 godzin po ostatnim posiłku i po oddaniu moczu założono kaniulę do żyły przedramienia. Badany pozostawał w pozycji leżącej przez dalsze 30 minut. Dokonywano pomiaru ciśnienia tętniczego i czynności serca. Po stabilizacji ciśnienia i czynności serca pobrano próbki krwi.

Stężenie OPG w surowicy oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) z użyciem zestawu firmy *R&D System Europa Ltd*. Stężenie w surowicy wysokoczułego białka C-reaktywnego (hsCRP, *high sensitive C-reactive protein*) oznaczano czułą metodą turbidymetrii.

Tabela I. Charakterystyka badanych grup

Table I. Characteristic of studied groups

Parametr	Pacjenci z nadciśnieniem tętniczym	Grupa kontrolna	p
n	30	10	
Mężczyźni/kobiety	16/14	6/4	NS
Wiek (lata)	45,2 \pm 13,3	43,0 \pm 12,3	NS
BMI [kg/m ²]	26,2 \pm 3,3	24,5 \pm 4,4	NS
Obwód pasa [cm]	83,7 \pm 7,4	82,2 \pm 13,0	NS
SBP [mm Hg]	154,2 \pm 11,6	123,0 \pm 8,0	< 0,05
DBP [mm Hg]	89,4 \pm 5,5	75,7 \pm 4,6	< 0,05

BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała; SBP (*systolic blood pressure*) — skurczowe ciśnienie tętnicze; DBP (*diastolic blood pressure*) — rozkurczowe ciśnienie tętnicze

metrii, a stężenie TNF- α — metodą radioimmunologiczną (RIA, *radioimmuno assay*).

Obliczenia statystyczne przeprowadzono za pomocą programu Statistica for Windows firmy *Stat-Soft Inc.* Normalność rozkładu zmiennych weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. W przypadku zmiennych, których rozkład istotnie odbiegał od normalnego, stosowano transformację przez logarytmowanie w celu uzyskania rozkładów niewykazujących znacznych odstępstw od rozkładu normalnego. Wartości zmiennych między grupami porównano za pomocą testu *t*-Studenta. Do określenia zależności między poszczególnymi zmiennymi zastosowano współczynnik korelacji liniowej Pearsona. Wszystkie wykazane różnice i wyznaczone współczynniki korelacji przyjęto za statystycznie istotne przy poziomie istotności *p* poniżej 0,05.

Wyniki

1. W grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym stężenia hsCRP oraz TNF- α w surowicy znacząco statystycznie przewyższały wartości obserwowane u osób z grupy kontrolnej ($p < 0,05$; tab. II).

2. Stężenia OPG były istotnie statystycznie wyższe w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym ($p < 0,05$; tab. II).

3. Stwierdzono dodatnią korelację między stężeniami OPG i TNF- α ($r = 0,474$; $p = 0,008$; ryc. 1).

Dyskusja

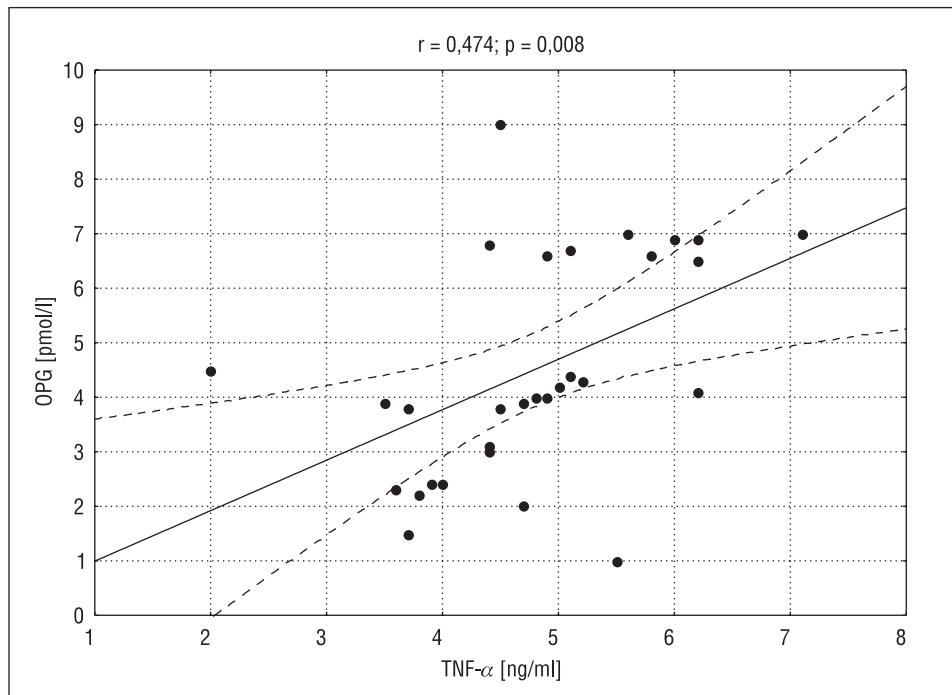
Nadciśnienie tętnicze jest chorobą szeroko rozprzeczoną na całym świecie, prowadząc rocznie do śmierci ponad 7 milionów osób. W świetle naj-

Tabela II. Stężenia hsCRP, TNF- α oraz OPG w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i grupie kontrolnej

Table II. hsCRP, TNF- α and OPG concentration in patients with hypertension and in the control group

Parametr	Pacjenci z nadciśnieniem tętniczym	Grupa kontrolna	p
n	30	10	
Mężczyźni/kobiety	16/14	6/4	NS
Wiek (lata)	45,2 \pm 13,3	43,0 \pm 12,3	NS
hsCRP [mg/l]	4,4 \pm 2,5	0,5 \pm 1,1	< 0,05
TNF- α [ng/ml]	4,8 \pm 1,0	2,5 \pm 0,9	< 0,05
OPG [pmol/l]	4,5 \pm 2,0	2,5 \pm 0,9	< 0,05

hsCRP (*high sensitive C-reactive protein*) — wysokoczułe białko C-reaktywne; TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) — czynnik martwicy nowotworów α ; OPG (*osteoprotegerin*) — osteoprotegeryna



Rycina 1. Dodatnia korelacja między stężeniami osteoprotegeryny (OPG) i czynnika martwicy nowotworów TNF- α (TNF- α) w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym

Figure 1. Positive correlation between osteoprotegerin (OPG) and tumor necrosis factor α (TNF- α) concentration in patients with hypertension

nowszych danych problem długotrwale podwyższonych wartości ciśnienia tętniczego dotyczy ponad miliarda osób na całym świecie [14–16].

Nadcisnienie tętnicze prowadzi do licznych powikłań, takich jak: przerost lewej komory serca, udar mózgu, upośledzona czynności nerek i ich niewydolność, rozwarstwienie aorty i zmiany w naczyniach siatkówki. W istotny sposób przyspiesza rozwój miażdżycy. W świetle dowodów z ostatnich lat istotne miejsce w rozwoju miażdżycy na wszystkich jej etapach zajmuje przewlekły proces zapalny.

Wyniki uzyskane przez autorów niniejszej pracy wskazują, że w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym występują wyższe stężenia w surowicy markerów stanu zapalnego, tj. hsCRP i TNF- α , co potwierdza wcześniejsze doniesienia o zapalnej składowej w patogenezie tej choroby [1–3, 17, 18]. Poszukuje się wyjaśnienia mechanizmów prowadzących do nasilania procesu zapalnego w nadciśnieniu tętniczym. Jednym z proponowanych mechanizmów jest uszkodzenie śródbłonna wskutek zwiększonego ciśnienia hydrostatycznego [19]. Do innych ważnych czynników pobudzających wydzielanie mediatorów stanu zapalnego należy zaliczyć angiotensynę II. Wykazano związek między zwiększonymi stężeniami angiotensyny II w surowicy krwi i nadmierną sekrecją cytokin. Jednak samoistne nadciśnienie tętnicze może być nie tylko przyczyną, ale także konsekwencją przewlekłego stanu zapalnego, co potwierdzają wyniki badań wykazujące, że zwiększone stężenie CRP w surowicy poprzedza rozwój nadciśnienia tętniczego [20, 21].

Istnieją dowody na to, że jeden z potencjalnych mechanizmów łączący proces zapalny z przyspieszoną aterogenezą zależy od aktywacji ekspresji OPG. W swojej pracy autorzy stwierdzili występowanie dodatniej korelacji między stężeniami TNF- α i OPG w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Dowiedziona korelacja między tymi stężeniami jest zgodna z tezą o indukcyjnym wpływie czynników zapalnych na ekspresję i produkcję OPG [22–26]. Oddziaływanie cytokin, które powodują wapnienie ścian tętnic, prowadząc do postępu zmian miażdżycowych i równocześnie hamowania wapnienia kości (co skutkuje osteoporozą), wydaje się doskonale odwzorowywać znaną reakcję tkanek na czynnik infekcyjny lub ciało obce, czyli powstawanie zwapnień w tkankach miękkich i demineralizację w tkance kostnej. Wyższe stężenia OPG uzyskane przez autorów tej pracy u chorych z nadciśnieniem tętniczym potwierdzają wcześniejsze doniesienia o korelacji między stężeniem OPG i głównymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego, takimi jak: wiek, cukrzyca, wskaźnik talia–biodro, profil lipidowy, nadciśnienie tętnicze i stężenie homocysteiny [26–37].

Uzyskane wyniki to krok do sprecyzowania roli OPG u osób z nadciśnieniem tętniczym. Cytokiny, które stymulują wapnienie komórek mięśni gładkich tętnic i nasilają procesy miażdżycowe, równocześnie zwiększają produkcję OPG, prawdopodobnie w ramach mechanizmu ochronnego, przeciwdziałającego procesom kalcyfikacji naczyń krwionośnych. Ponadto internalizacja kryształów wapnia przez makrofagi stymuluje sekrecję prozapalnych cytokin zwiększających produkcję OPG i w ten sposób powstaje samonapędzający się mechanizm.

Dotychczasowe doniesienia wskazują na występowanie dodatniej korelacji między stężeniem OPG i wartościami wybranych wskaźników zapalenia (CRP, fibrynogenu, odczynu Biernackiego) w ogólnej populacji, a także w grupach pacjentów z chorobą wieńcową, cukrzycą i reumatoidalnym zapaleniem stawów. Zdolność czynników zapalnych, takich jak TNF- α , interleukina 1 czy płytkopochodny czynnik wzrostu, do wzmagania ekspresji i produkcji OPG może tłumaczyć dodatnią korelację między stężeniem OPG a chorobami układu sercowo-naczyniowego. Sugestię, że wzrost stężenia OPG jest skutkiem zapalenia, potwierdza działanie czynników przeciwzapalnych, takich jak leki immunosupresyjne czy terapia anty-TNF- α , które obniżają stężenie OPG.

Wnioski

Nadcisnienie tętnicze nasila proces zapalny. Związek podwyższonego stężenia OPG z TNF- α , kluczowym markerem stanu zapalnego, może stanowić wyjaśnienie współwystępowania kalcyfikacji tętnic wieńcowych i progresji miażdżycy ze stanem zapalnym w tej grupie pacjentów. W świetle uzyskanych wyników OPG jawi się nie tylko jako wskaźnik, ale także mediator patologii naczyń krwionośnych.

Streszczenie

Wstęp W ostatnich badaniach wykazano, że stężenie osteoprotegryny (OPG) w surowicy wzrasta w związku z postępowaniem zmian miażdżycowych tętnic wieńcowych, chorobą wieńcową, zawałem serca i przyszlými chorobami układu sercowo-naczyniowego. Celem pracy było oznaczenie stężenia OPG i poszukiwanie związku między OPG i wybranymi markerami zapalnymi u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. **Materiał i metody** Do badania włączono 30 pacjentów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym. Grupę kontrolną stanowiło 10 zdrowych osób. Przeprowa-

dzono pełne badanie kliniczne. U wszystkich uczestników badania oznaczono stężenie OPG w surowicy metodą immunoenzymatyczną, stężenie w surowicy wysokoczułego białka C-reaktywnego (hsCRP) — metodą turbidymetrii i czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α) — metodą radioimmunometryczną. **Wyniki** U pacjentów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym stężenia OPG, hsCRP oraz TNF- α w surowicy krwi znacząco statystycznie przewyższały wartości obserwowane u osób z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Stwierdzono również dodatnią korelację między stężeniami OPG i TNF- α ($p < 0,05$).

Wnioski Nadciśnienie tętnicze cechuje nasilony proces zapalny. Wzajemna relacja stężenia OPG i stężenia TNF- α może stanowić wyjaśnienie współwystępowania kalcyfikacji tętnic wieńcowych i progresji miażdżycy ze stanem zapalnym w tej grupie pacjentów.

słowa kluczowe: nadciśnienie tętnicze, osteoprotegeryna, czynnik martwicy nowotworów, miażdżycza

Nadciśnienie Tętnicze 2010, tom 14, nr 5, strony 375–380.

Piśmiennictwo

- Chae C., Lee R., Rifai N., Ridker P. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 2001; 38: 399–403.
- Stumpf C., John S., Jukic J. i wsp. Enhanced levels of platelet P-selectin and circulating cytokines in young patients with mild arterial hypertension. *J. Hypertens.* 2005; 23: 995–1000.
- Sung K., Suh J., Kim B. i wsp. High sensitivity C-reactive protein as an independent risk factor for essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2003; 16: 429–433.
- Bagger Y., Tanko L., Alexandersen P. i wsp. Radiographic measure of aorta calcification is a site-specific predictor of bone loss and fracture risk at the hip. *J. Intern. Med.* 2006; 259: 598–605.
- Hak A., Pols H., van Hemert A., Hofman A., Witteman J. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1926–1931.
- Kiel D., Kauppila L., Cupples L. i wsp. Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study. *Calcif. Tissue Int.* 2001; 68: 271–276.
- Schulz E., Arfai K., Liu X., Sayre J., Gilsanz V. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: 4246–4253.
- Tanko L., Bagger Y., Christiansen C. Low bone mineral density in the hip as a marker of advanced atherosclerosis in elderly women. *Calcif. Tissue Int.* 2003; 73: 15–20.
- Barengolts E., Berman M., Kukreja S., Kouznetsova T., Lin C., Chomka E. Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* 1998; 62: 209–213.
- Uyama O., Yoshimoto Y., Yamamoto Y., Kawai A. Bone changes and carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Stroke* 1997; 28: 1730–1732.
- Simonet W., Lacey D., Dunstan C. i wsp. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309–319.
- Orita Y., Yamamoto H., Kohno N. i wsp. Role of osteoprotegerin in arterial calcification development of new animal model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 2058–2064.
- Bennett B., Scatena M., Kirk E. i wsp. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older apoE^{-/-} mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 2117–2124.
- National High Blood Pressure Education Program. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Bethesda (MD): National Heart, Lung, and Blood Institute (US); 2004.
- World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. World Health Organization, Geneva 2002.
- Romano-Spica V., Mettimano M., Ianni A., Specchia M.L., Ricciardi G., Savi L. Epidemiology of essential hypertension: the role of genetic polymorphism. *Eur. J. Epidemiol.* 2002; 18: 211–219.
- Patel J., Lim H., Dubb K., Hughes E., Lip G. Circulating levels of adiponectin, leptin, and tumor necrosis factor- α in hypertension. *Ann. Med.* 2009; 41: 291–300.
- Sesso H., Buring J., Rifai N., Blake G., Gaziano J., Ridker P. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 2003; 290: 2945–2951.
- Preston R., Jy W., Jimenez J. i wsp. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 2003; 41: 211–217.
- Sung K., Suh J., Kim B. i wsp. High sensitivity C-reactive protein as an independent risk factor for essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2003; 16: 429–433.
- Sesso H., Buring J., Rifai N., Blake G., Gaziano J., Ridker P. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 2003; 290: 2945–2951.
- Hofbauer L., Schoppert M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004; 292: 490–495.
- Zhang J., Fu M., Myles D. i wsp. PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. *FEBS Lett.* 2002; 521: 180–184.
- Collin-Osdoby P., Rothe L., Anderson F., Nelson M., Maloney W., Osdoby P. Receptor activator of NF- κ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 20 659–20 672.
- Tintut Y., Patel J., Parhami F., Demer L. Tumor necrosis factor- α promotes *in vitro* calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 2000; 102: 2636–2642.
- Tintut Y., Patel J., Territo M., Saini T., Parhami F., Demer L. Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification *in vitro*. *Circulation* 2002; 105: 650–655.
- Abedin M., Omland T., Ueland T. i wsp. Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas Heart Study). *Am. J. Cardiol.* 2007; 99: 513–518.
- Asanuma Y., Chung C., Oeser A. i wsp. Serum osteoprotegerin is increased and independently associated with coronary artery atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2007; 95: 135–141.
- Anand D., Lahiri A., Lim E., Hopkins D., Corder R. The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coro-

nary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47: 1850–1857.

30. Rasmussen L., Tarnow L., Hansen T., Parving H., Flyvbjerg A. Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status, systolic blood pressure, kidney function and cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients. *Eur. J. Endocrinol.* 2006; 54: 75–81.

31. Xiang G., Xu L., Zhao L., Yue L., Hou J. The relationship between plasma osteoprotegerin and endothelium-dependent arterial dilation in type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 2126–2131.

32. Gannage-Yared M., Fares F., Semaan M., Khalife S., Jambart S. Circulating osteoprotegerin is correlated with lipid profile, insulin sensitivity, adiponectin and sex steroids in an ageing male population. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2006; 64: 652–658.

33. Oh E., Rhee E., Oh K. i wsp. Circulating osteoprotegerin levels are associated with age, waist-to-hip ratio, serum total

cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy Korean women. *Metabolism* 2005; 54: 49–54.

34. Szulc P., Hofbauer L., Heufelder A., Roth S., Delmas P. Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 3162–3165.

35. Kudlacek S., Schneider B., Woloszczuk W., Pietschmann P., Willvonseder R.; Austrian Study Group on Normative Values of Bone Metabolism. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003; 32: 681–686.

36. Knudsen S., Foss C., Poulsen P., Andersen N., Mogensen C., Rasmussen L. Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microvascular complications. *Eur. J. Endocrinol.* 2003; 149: 39–42.

37. Khosla S., Atkinson E., Dunstan C., O'Fallon W. Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 1550–1554.