

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu
Wydział Lekarski I

Katarzyna Hen
Ocena stężenia osteoprotegeryny oraz kompleksu intima-media
u chorych z zespołem metabolicznym

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Danuta Pupek-Musialik

Pani profesor Danucie Pupek-Musialik
dziękuję
za okazane serce i wsparcie w pracy

Spis treści:

1. Wstęp	6
1.1. Zespół metaboliczny - definicja i epidemiologia.....	6
1.2. Insulinooporność.....	9
1.3. Stan zapalny.....	11
1.4. Adipocyty, efekt hormonalny.....	12
1.5. Insulinooporność a WKT.....	14
1.6. Uwarunkowania genetyczne ZM.....	14
1.7. Rola kompleksu IM w diagnostyce sercowo-naczyniowej.....	15
1.7.1. Definicja.....	15
1.7.2. IMT a miażdżycy.....	16
1.8. Osteoprotegeryna.....	18
1.8.1. Odkrycie i kierunki badań nad osteoprotegeryną.....	18
1.8.2. Osteoprotegeryna w układzie sercowo-naczyniowym.....	22
1.8.3. Modele zwierzęce.....	23
1.8.4. Osteoprotegeryna w badaniach in vivo.....	25
1.8.5. Osteoprotegeryna a choroby układu sercowo-naczyniowego.....	25
2. Cel pracy	29
3. Materiał i metody	29
3.1. Badana populacja.....	29
3.2. Metodyka.....	31
4. Krytyka metody	37
5. Metody statystyczne	39
6. Wyniki	40
7. Omówienie	51
7.1. OPG a ZM.....	51
7.2. Czynniki wpływające na stężenie OPG.....	51
7.3. IMT a ZM.....	56
7.4. OPG a IMT. OPG – nowy marker miażdżycy?.....	61
7.5. OPG a IMT – czy OPG bierze udział w początkowym etapie rozwoju miażdżycy?..	62
7.6. Jak możemy zmniejszyć stężenie OPG? Kliniczne aspekty.....	68
7.7. Czy OPG możemy traktować jako marker prognostyczny?.....	68
8. Wnioski	70
9. Streszczenie	71
10. Piśmiennictwo	75
11. Aneks	92

Wykaz skrótów:

Activator of Nuclear Factor κ B – Ligand receptorowego aktywatora czynnika jądrowego
AIAT – aminotransferaza alaninowa
AMPK – AMP kinaza
AspAT – aminotransferaza asparaginianowa
bFGF - *Basic Fibroblast Growth Factor*
BMI - *Body Mass Index* – wskaźnik masy ciała
BMP - *bone morphogenic protein* – białko morfogenetyczne kości
BMP4 - *Bone Morphogenetic Protein 4* - białko morfogenetyczne kości 4
CCA – *Common Carotid Artery* – tętnica szyjna wspólna
cDNA - komplementarny DNA
ChOD – oksydaza cholesterolowa
CRP – *C-reactive protein* – białko C-reaktywne
DBP- *diastolic blood pressure* – rozkurczowe ciśnienie tętnicze
DCs – *dendritic cells* – komórki dendrytyczne
ECh – esteraza cholesterolowa
ECs – *Endothelial Cells* – komórki śródbłonna
EGIR - *the European Group for the Study of Insulin Resistance*
ERK – *extracellular MAPK* - pozakomórkowa MAPK
ESC - *European Society of Cardiology* - Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne
ESH - *European Society of Hypertension* - Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego
gen FTO - *fat mass and obesity associated gene*
GLUT – transporter glukozy
HDL - *High Density Lipoprotein* – lipoproteina wysokiej gęstości
HOMA IR - *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* – wskaźnik insulinooporności
hsCRP – *high-sensitivity C-reactive protein* - wysokoczułe białko C-reaktywne
ICAM – 1 - *intercellular adhesion molecule -1* – wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezji- 1
IDF - *International Diabetes Federation* – Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna
IKK – β - *I kappa B kinase beta* – I kappa B kinaza beta
IL-1 β - *interleukin 1 β* - interleukina 1 β
IL-6 – *interleukin 6* - interleukina 6
IL-8 - *interleukin 8* - interleukina 8
IM - *Intima Media* – błona wewnętrzna i środkowa
IMT - *Intima Media Thickness* - grubość błony wewnętrznej i środkowej
INS - insulina
IRS - *Insulin Receptor Substrate* – substraty receptora insulinowego
ISI – *Insulin Sensitivity Index* – wskaźnik insulinooporności
JNK - C – *jun N – terminal kinase* – N – końcowa kinaza C – jun
kgFAT - bezwzględna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie
LDL - *Low Density Lipoprotein* – lipoproteina niskiej gęstości

LDLR – receptor LDL

MAPK – *mitogen-activated protein kinase* - kinaza białkowa aktywowana mitogenem

MCP-1 - *monocyte chemotactic protein-1* - białko chemotaktyczne dla monocytów -1

M-CSF - *Macrophage Colony-Stimulating Factor* - czynnik pobudzający kolonie makrofagów

MGP – *Matrix Gla Protein*

NATPOL-PLUS – Nadciśnienie Tętnicze w Polsce Plus Zaburzenia Lipidowe i Cukrzyca

NCEP ATP III - *the National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel*

NF κ B - *Nuclear Factor κ B*- czynnik jądrowy κ B

NO - *nitric oxide* – tlenek azotu

NS – brak istotności statystycznej

OCPs - *Osteoclast Precursors* – prekursorzy osteoklastów

OPG – *osteoprotegerin* - osteoprotegeryna

OZW – ostry zespół wieńcowy

p – poziom istotności

PI3K – *the phosphatidylinositol 3-kinase* - kinaza 3 fosfatydyloinozytolu

PAI-1 - *plasminogen activator inhibitor 1* - inhibitor aktywatora plazminogenu 1

PDGF - *Platelet-Derived Growth Factor*

POD - peroksydaza

RANKL/OPG/RANK - *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand/Osteoprotegerin/Receptor Activator of Nuclear Factor κ B* – Ligand receptorowego aktywatora czynnika jądrowego κ B/Osteoprotegeryna/Receptorowy aktywator czynnika jądrowego κ B

SBP - *systolic blood pressure* – skurczowe ciśnienie tętnicze

SCORE – *Systematic COronary Risk Evaluation* – skala oceny ryzyka sercowo-naczyniowego

SOCS - *suppressor of cytokine signaling*

TCH – cholesterol całkowity

TG – triglicerydy

TNF- α - *tumor necrosis factor* – α - czynnik martwicy nowotworu – α

TRAF 6 - *TNF receptor associated factor 6* - czynnik 6 związany z receptorem TNF

TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand* – ligand indukujący apoptozę zależną od TNF

VCAM-1 - *vascular cell adhesion molecule -1* – naczyniowa cząsteczka adhezji komórek - 1

VSMCs – *Vascular Smooth Muscle Cells* – komórki mięśni gładkich naczyń

vWF - *von Willebrand factor* – czynnik von Willebranda

WBP – *Weibel-Palade Bodies*

WHO - *the World Health Organization* – Światowa Organizacja Zdrowia

WHR – *Waist to Hip Ratio*- wskaźnik talia biodro

WKT – wolne kwasy tłuszczowe

WOBASZ - Wieloośrodkowe Ogólnopolskie BAdanie Stanu Zdrowia ludności

ZM – zespół metaboliczny

%FAT – względna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie

1. Wstęp

1.1. Zespół metaboliczny - definicja i epidemiologia

W ciągu ostatnich dwóch dekad w większości rozwiniętych krajów świata obserwuje się stały i znaczny wzrost częstości występowania nadwagi i otyłości. Już w 1997 roku Światowa Organizacja Zdrowia zaliczyła otyłość do światowych epidemii. [1] Wg szacunkowych danych na rok 2005 globalnie otyłość występowała u 400 milionów dorosłych, nadwaga u 1,6 miliarda dorosłych (powyżej 16. roku życia). Do roku 2015 szacuje się wzrost liczby ludzi otyłych do 700 milionów. [2] Nowe dane szacunkowe (na rok 2010) podają, około 475 milionów otyłych ludzi i 1 miliard ludzi z nadwagą na całym świecie. Definiując natomiast otyłość u azjatów jako wartość BMI $>28 \text{ kg/m}^2$ (Body Mass Index – wskaźnik masy ciała) szacunkowa liczba otyłych ludzi globalnie wzrasta do 600 milionów. W krajach Unii Europejskiej szacuje się, że około 60% dorosłych i 15 - 20% dzieci jest otyłych lub ma nadwagę. [3]

Istnieją tylko pojedyncze doniesienia o zahamowaniu tego trendu. [4] Szczególne zainteresowanie problemem epidemii otyłości wynika z faktu, że stanowi ona czynnik ryzyka wielu chorób przewlekłych, głównie układu sercowo-naczyniowego. A rozpowszechnienie otyłości czyni ją poważnym problemem zdrowotnym i społecznym. [5, 6]

Zespół metaboliczny (ZM) stanowi połączenie najistotniejszych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego: otyłości brzusznej, stanu przedcukrzycowego, cukrzycy, podwyższonego ciśnienia tętniczego, zaburzeń gospodarki lipidowej. [7] Jedna czwarta populacji ludzi dorosłych na świecie spełnia kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego. Zespół metaboliczny dwukrotnie zwiększa ryzyko zgonu z powodu zawału serca i udaru mózgu, trzykrotnie zwiększa ryzyko zachorowania na te choroby. Osoby z zespołem metabolicznym prezentują pięciokrotnie zwiększone ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2. [8] Natomiast niemalże 80% z 200 milionów ludzi chorych na cukrzycę na całym świecie umrze z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego. Powyższe dane stawiają zespół metaboliczny jako jedną z głównych przyczyn zachorowalności i śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych na świecie. Wczesne rozpoznanie zespołu metabolicznego jest więc konieczne aby odwrócić ten niebezpieczny trend i skutecznie walczyć z epidemią chorób układu sercowo-naczyniowego.

Obecność zespołu metabolicznego zwiększa ryzyko sercowo-naczyniowe bardziej, niż wynikałoby to z prostego, zsumowanego działania poszczególnych jego składników. Udowodniono, że obecność czynników ryzyka składających się na zespół metaboliczny u osób o niskim ryzyku zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych według skali SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation – skala oceny ryzyka sercowo-naczyniowego) wpływa istotnie na grubość kompleksu IM (Intima Media – błona wewnętrzna i środkowa) tętnicy szyjnej. [9]

Na przestrzeni ostatnich lat powstawało wiele definicji zespołu metabolicznego. Najpopularniejsze zostały stworzone przez WHO (the World Health Organization), EGIR (the European Group for the Study of Insulin Resistance) i NCEP ATP III (the National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel). Wszystkie definicje jako kluczowe elementy zespołu metabolicznego uznały: otyłość, insulinooporność, dyslipidemię i otyłość brzuszną. Potrzeba jednolitego określenia problemu oraz wyposażenia lekarzy pierwszego kontaktu w proste narzędzie identyfikacji pacjentów ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym zaowocowały stworzeniem w roku 2005 nowej definicji przez IDF (International Diabetes Federation). [10]

Według nowej definicji do rozpoznania zespołu metabolicznego konieczne jest stwierdzenie:

- otyłości brzusznej zdefiniowanej jako obwód pasa większy lub równy 94 cm u mężczyzn i 80 cm u kobiet (wartości dla krajów europejskich)
- dwóch spośród poniższych czynników:
 - stężenie triglicerydów (TG) równe lub większe od 1,7 mmol/l (150 mg/dl), lub leczenie tego zaburzenia lipidowego,
 - stężenie cholesterolu HDL (High Density Lipoprotein – lipoproteina wysokiej gęstości) mniejsze od 1,03 mmol/l (40 mg/dl) u mężczyzn i mniejsze od 1,29 mmol/l (50 mg/dl) u kobiet, lub leczenie tego zaburzenia lipidowego,
 - ciśnienie skurczowe równe lub większe niż 130 mmHg lub ciśnienie rozkurczowe równe lub większe niż 85 mmHg, lub leczenie wcześniej rozpoznanego nadciśnienia tętniczego,
 - stężenie glukozy na czczo równe lub większe niż 5,6 mmol/l (100 mg/dl), lub wcześniej zdiagnozowana cukrzyca typu 2.

Ponieważ z zespołem metabolicznym związane jest zwiększone ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2 i chorób układu sercowo-naczyniowego stanowi on poważny medyczny i ekonomiczny problem. Konieczna jest więc jak najwcześniejsza identyfikacja pacjentów z zespołem metabolicznym (wykrycie jednej składowej tego zespołu jest wskazaniem do planowego poszukiwania innych). Powszechnie akceptowana definicja oparta o pomiary obwodu pasa, ciśnienia tętniczego oraz stężeń triglicerydów, cholesterolu HDL i glukozy umożliwia wczesne wdrożenie zmian stylu życia i interwencji farmakologicznych.

Patogeneza zespołu metabolicznego jest problemem złożonym i nie została dobrze poznana, jednak otyłość centralna i insulinooporność są uznane jako najistotniejsze składowe ZM. Otyłość brzuszna, inaczej centralna, łatwa do określenia przy użyciu pomiaru obwodu pasa, jest więc zasadniczym wymogiem rozpoznania zespołu metabolicznego. Natomiast insulinooporność, trudniejsza do zdiagnozowania w codziennej praktyce klinicznej stanowi ważny element dyskusji w piśmiennictwie podnoszącym jej związek z otyłością oraz zdarzeniami sercowo-naczyniowymi.

Częstość zespołu metabolicznego w dorosłej populacji na świecie określona w ostatnich latach na 20 – 25%, jest zbliżona wśród mężczyzn i kobiet. Natomiast znacząco wzrasta z wiekiem: od 7% wśród 20-latków do ponad 40% w populacji powyżej 60 roku życia. [11]

Z danych uzyskanych w badaniu WOBASZ (Wieloośrodkowe Ogólnopolskie BAdanie Stanu Zdrowia ludności) w latach 2003 – 2005, wynika, że zespół metaboliczny w Polsce występuje średnio u co 5.-tej osoby w wieku 20 – 74 lat. Badania populacyjne przeprowadzono u 6114 mężczyzn i 6894 kobiet, stanowiących reprezentatywną próbę mieszkańców Polski w wieku 20 – 74 lat. Zespół metaboliczny obserwowano u 23% mężczyzn i 20% kobiet, a częstość jego rosła z wiekiem. Zaledwie 4% kobiet w wieku 20 – 39 lat spełniało kryteria zespołu metabolicznego, natomiast w wieku 60 – 74 lat rozpowszechnienie zespołu metabolicznego wzrosło do 46%; wśród mężczyzn odsetki te wynosiły odpowiednio 10% i 35%. Badanie WOBASZ wykazało również znaczne regionalne zróżnicowanie w rozpowszechnieniu zespołu metabolicznego. W regionach Polski zachodniej występował 1,5 – 2 – krotnie częściej niż w regionach południowo-wschodnich. [12]

Badanie WOBASZ potwierdza obserwacje innych badań epidemiologicznych, prowadzonych w Polsce w latach 2001 – 2002 (NATPOL-PLUS – Nadciśnienie

Tętnicze w Polsce Plus Zaburzenia Lipidowe i Cukrzyca, Pol-MONICA). W ogólnopolskim badaniu NATPOL-PLUS częstość występowania zespołu metabolicznego oceniano na grupie 2329 kobiet i mężczyzn. Badanie to wykazało, że zespół metaboliczny występuje u 20,3% dorosłych mieszkańców naszego kraju i jego częstość wyraźnie rośnie z wiekiem. [13] Badanie Pol-MONICA Warszawa monitorujące stan zdrowia ludności prawobrzeżnej Warszawy w wieku 35 – 64 lat, wykazało, że w 2001 roku zespół metaboliczny występował u 20% mężczyzn oraz 19% kobiet. Odsetki te były dwukrotnie większe u mężczyzn i trzykrotnie większe u kobiet w stosunku do obserwacji z 1988 roku. Wskazuje to na szybko narastający problem epidemii zespołu metabolicznego również w populacji polskiej. [14]

U mieszkańców Polski badanych w programie WOBASZ stwierdzono, że prowadzenie zdrowego trybu życia (spożywanie odpowiedniej ilości warzyw i owoców, regularna aktywność fizyczna, utrzymywanie prawidłowej masy ciała, niepalenie papierosów) wiąże się z mniejszą częstością wystąpienia zespołu metabolicznego. Jest to kolejny dowód na to, jak ważne są interwencje edukacyjne lekarzy pierwszego kontaktu, kardiologów i autorytetów medycznych. [15]

Wstępne wyniki badania NATPOL 2011 pokazują, że w ostatniej dekadzie istotnie wzrósł odsetek osób otyłych. Otyłych mężczyzn jest obecnie 5% więcej niż 10 lat temu. Stanowią oni prawie 1/4 wszystkich mężczyzn w Polsce. [16]

Określenie zasadniczej przyczyny zespołu metabolicznego pozostaje jednak nadal wyzwaniem dla ekspertów, ale zarówno insulinooporność, jak i otyłość brzuszna są uznawane za istotne kryteria rozpoznania ZM. Z praktycznego punktu widzenia nie ma potrzeby rozdzielania tych dwóch stanów. Insulinooporność uznawana jest za sedno zespołu metabolicznego, natomiast otyłość brzuszna jest jej powszechnie występującą kliniczną manifestacją.

1.2. Insulinooporność

Insulinoopornością nazywamy stan zmniejszonego działania insuliny na tkanki docelowe, pomimo prawidłowego lub podwyższonego stężenia insuliny w surowicy krwi. Insulina jest anabolicznym hormonem odgrywającym znaczącą rolę w metabolizmie glukozy, tłuszczów i białek, wpływa także na wzrost komórek, ich różnicowanie oraz funkcję śródbłonna. Liczne działania insuliny tłumaczą różnorodność kliniczną zespołu metabolicznego. [17] Insulina łączy się w komórkach

ze specyficznym receptorem, wywołując jego fosforylację lub fosforylację substratów wewnątrzkomórkowych, aktywując kinazę tyrozynową i dalsze szlaki sygnałowe. Efekt działania insuliny rozpoczynany jest poprzez fosforylację białek będących substratami receptora insulinowego (IRS Insulin Receptor Substrate). Poznane cztery białka IRS wykazują specyficzność tkankową, np.: IRS -1 dla mięśni szkieletowych, IRS-2 dla wątroby. Fosforylacja ta uruchamia dwa główne szlaki sygnałowe: PI3K – kinaza 3 fosfatydyloinozytolu (the phosphatidylinositol 3-kinase), odpowiedzialna za wychwyt glukozy przez mięśnie i tkankę tłuszczową i hamowanie glukoneogenezy, oraz MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenem (mitogen-activated protein kinase), regulująca ekspresję genów i pośrednio kontrolująca wzrost komórek i ich różnicowanie.

W przeciwieństwie do tyrozynowej fosforylacji – serynowa fosforylacja IRS blokuje szlaki sygnałowe insuliny. Przykładowymi kinazami serynowymi, które poprzez fosforylację IRS – 1 blokują działanie insuliny, są: IKK – β (I kappa B kinase beta – I kappa B kinaza beta), JNK (C – jun N – terminal kinase – N – końcowa kinaza C - jun) oraz inne MAPKs. Wymienione kinazy serynowe IRS są typowymi mediatorami szlaków sygnałowych procesu zapalnego, łączą proces zapalny z insulinoopornością na poziomie komórkowym. Innymi mediatorami łączącymi powyższe procesy są: SOCS (supressor of cytokine signaling) i NO (nitric oxide – tlenek azotu). [18, 19]

Oporność na insulinę może być spowodowana różnymi czynnikami: genetycznymi i nabytymi. Wyłączając kilka rzadszych przyczyn obejmujących obecność przeciwciał przeciwko receptorowi insuliny, mutacje w obrębie genu kodującego receptor insulinowy, w ZM większość autorów wskazuje na postreceptorowy charakter insulinooporności. Wrażliwość na insulinę zależy od liczby i powinowactwa receptorów insulinowych, ale też od stanu funkcjonalnego wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Najczęściej oporność na insulinę powodowana jest zaburzeniem funkcji układu przekazywania sygnałów. Zjawiska postreceptorowej transdukcji sygnału insuliny zależne są od wielu białek pełniących funkcję wewnątrzkomórkowych mediatorów. Aktywność tych białek zależy przede wszystkim od procesu fosforylacji, w którym kinaza tyrozynowa lub kinaza serynowa powoduje przyłączenie reszt fosforanowych do tyrozyny lub seryny. Drugim bardzo ważnym procesem jest defosforylacja, która polega na usuwaniu grup fosforanowych przy udziale fosfataz białkowych. Na obu wymienionych wyżej procesach oparty jest mechanizm aktywowania i dezaktywowania poszczególnych białek. Insulinooporność

wyraża się także osłabieniem stymulowanego przez insulinę dokomórkowego transportu glukozy, obniżeniem jej metabolizmu w tkance tłuszczowej i mięśniach szkieletowych oraz upośledzeniem supresji uwalniania glukozy z wątroby. [20]

Reasumując, insulinooporność w ZM wyraża się osłabieniem stymulowanego przez insulinę transportu dokomórkowego glukozy, obniżeniem jej metabolizmu w tkance tłuszczowej i mięśniach szkieletowych oraz upośledzeniem supresji uwalniania glukozy z wątroby. Te funkcjonalne zmiany wynikają z upośledzonej transdukcji sygnału insulinowego oraz obniżonego poziomu transportera glukozy GLUT4. Zarówno w tkance tłuszczowej, jak i mięśniach szkieletowych obserwuje się zmniejszoną zdolność wiązania się insuliny do swojego receptora, zmniejszoną aktywność kinazy tyrozynowej oraz fosforylację IRSs. [21]

Obserwowane w ZM zaburzenia są efektem zarówno oporności komórek mięśni i tkanki tłuszczowej na działanie insuliny, jak i nadmiernego efektu działania podwyższonych stężeń insuliny na tkanki, które wykazują prawidłową wrażliwość na insulinę. [22]

1.3. Stan zapalny

Ostatnie lata dostarczają coraz więcej dowodów świadczących o powiązaniu otyłości ze stanem zapalnym, który wydaje się uczestniczyć w rozwoju insulinooporności. Otyłych pacjentów cechuje stan zapalny o małym nasileniu, obrazowany przez podwyższone stężenia białka C reaktywnego (CRP – C-reactive protein), TNF- α (tumor necrosis factor – α , czynnik martwicy nowotworu – α), IL-6 (interleukin 6 - interleukina 6), MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1, białko chemotaktyczne dla monocytów -1) i IL-8 (interleukin 8 - interleukina 8) oraz leptyny i osteopontyny. [23, 24, 25]

Głównym źródłem mediatorów stanu zapalnego w obrębie tkanki tłuszczowej są makrofagi, których stężenie w obrębie tkanki tłuszczowej u otyłych chorych wzrasta znacząco. W otyłości dochodzi łatwo do hipertrofii adipocytów, która doprowadza do śmierci komórki. Obumarłe komórki tłuszczowe otaczane są właśnie przez makrofagi, których zadaniem jest ich usunięcie. Makrofagi te wydzielają (nawet bez stymulacji) olbrzymie ilości cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-6, IL-1 β (interleukin 1 β - interleukina 1 β). Cytokiny prozapalne indukują wątrobową produkcję białek ostrej fazy, generują reaktywne formy tlenu i biorą udział w funkcjonalnym i strukturalnym uszkodzeniu

śródbłónka. [26] Ponieważ tkanka tłuszczowa otyłych jest rozległym organem, makrofagi tkanki tłuszczowej odgrywają kluczową rolę w rozwoju stanu zapalnego indukowanego właśnie otyłością.

TNF- α odgrywa istotną rolę w indukowaniu insulinooporności receptorowej. Mechanizm tego zjawiska polega na blokowaniu przez TNF- α fosforylacji kinazy tyrozynowej podjednostki β receptora dla insuliny. W konsekwencji po przyłączeniu insuliny do jej receptora, dochodzi do zaburzeń kaskady przewodnictwa sygnału, translokacji przenośnika dla glukozy GLUT-4. Ponadto TNF- α może nasilać insulinooporność poprzez zwiększenie lipolizy oraz syntezy wolnych kwasów tłuszczowych (WKT).

Interleukina 6 jest substancją wydzielaną przez komórki układu immunologicznego oraz przez adipocyty. Jej działanie polega na stymulacji insulinooporności poprzez hamowanie aktywności lipazy lipoproteinowej, czego konsekwencją jest gromadzenie TG i WKT oraz indukcja osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, która pobudza syntezę kortyzolu i nasila powstawanie otyłości brzusznej. Ze względu na powszechną dostępność nadal jednak markerem stanu zapalnego o małym nasileniu związanego z zaburzeniami metabolicznymi i miażdżycą pozostaje wysokoczułe białko C reaktywne (hsCRP - high-sensitivity C-reactive protein).

1.4. Adipocyty, efekt hormonalny

Wśród mechanizmów regulujących ilość tkanki tłuszczowej i masę ciała, duże znaczenie mają sygnały pochodzące bezpośrednio z tkanki tłuszczowej. Wykazano, że nie jest ona tylko biernym magazynem tłuszczu, ale bierze udział regulacyjny w złożonych procesach bioenergetycznych, oddziałując na ośrodki w centralnym układzie nerwowym i prawdopodobnie na inne narządy odpowiedzialne za utrzymanie ustrojowej homeostazy energetycznej. Coraz częściej adipocyt traktowany jest jako zintegrowany endokrynno-metaboliczny system sygnałowy, który uczestniczy w kontroli metabolizmu energetycznego. [27]

Komórki tłuszczowe są zdolne do wytwarzania wielu białek regulujących ich własny metabolizm w odpowiedzi na bodźce nerwowe i hormonalne. Opisano szereg substancji, które w zależności od stężenia oddziałują auto- lub parakrynnie, a część z nich poprzez wydzielanie do krążenia ustrojowego również endokrynnie. Funkcje te w szczególny sposób są związane z tkanką tłuszczową trzewną. Tkanka tłuszczowa

trzewna, w odróżnieniu od tkanki tłuszczowej podskórnej, jest organem aktywnym metabolicznie, silnie zależnym od działania insuliny. Adipocyty tkanki tłuszczowej trzewnej różnią się w swoich funkcjach biologicznych i budowie histologicznej od adipocytów tkanki tłuszczowej podskórnej. Są większe, cechują się opornością na insulinę i zwiększoną lipolizą. Ponadto tkanka tłuszczowa trzewna jest miejscem syntezy wielu substancji hormonalnie czynnych zwanych adipokinami. Stężenia krążących adipokin o działaniu prozapalnym i proaterogennym: leptyny, TNF α , interleukiny 6 (IL-6), rezystyny, CRP, fibrynogenu, inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (plazminogen activator inhibitor 1- PAI-1) są znacząco zwiększone u osób otyłych. Natomiast stężenia adiponektyny, hormonu zwiększającego wrażliwość tkanek na działanie insuliny, o właściwościach przeciwmiażdżycowych są zmniejszone. [28, 29]

Leptyna jest hormonem hamującym apetyt poprzez swoje ośrodkowe działanie na podwzgórze. Stężenie leptyny jest ściśle dodatnio skorelowane z zawartością tłuszczu w organizmie oraz z BMI. Leptyna działa na insulinozależny metabolizm glukozy: nasila glukoneogenezę wątrobową, nasila lipolizę i hamuje lipogenezę. Efekt działania leptyny na mięśnie szkieletowe przejawia się pobudzeniem wychwytu glukozy i stymulacją glikoneogenezy. Na adipocyty działa antagonistycznie do insuliny. Ponadto leptyna pobudza układ współczulny i nasila termogenezę. [30]

Rezystyna z kolei uważana jest za czynnik łączący otyłość z występowaniem cukrzycy. Stwierdzono jej zwiększone stężenie w otyłości brzusznej. Zdaniem części autorów jest ona hormonem zwiększającym insulinooporność [31, 32]

Adiponektyna jest białkiem uwalnianym z tkanki tłuszczowej, ale w głównej mierze obwodowej. Reguluje ona przede wszystkim metabolizm wolnych kwasów tłuszczowych w wątrobie i mięśniach. Modulując aktywność szlaku sygnałowego AMP-kinazy (AMPK), adiponektyna umożliwia utrzymywanie równowagi energetycznej komórek, a tym samym prawidłową oksydację lipidów i syntezę glikogenu przy równoczesnym hamowaniu glikolizy, glukoneogenezy i syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych. Dzięki tym mechanizmom zachowana zostaje prawidłowa wrażliwość tkanek obwodowych na działanie insuliny. Wykazano, że synteza i uwalnianie adiponektyny z tkanki tłuszczowej obwodowej ulega hamowaniu przy hiperinsulinemii. Wykazano także, że sekrecja adiponektyny oraz ekspresja jej genu zmniejszają się w nadwadze, otyłości typu brzusznej i nadciśnieniu tętniczym.

Zaburzenia równowagi między insuliną a adiponektyną wiążą się z nasiloną sekrecją katecholamin i glikokortykosteroidów odpowiedzialnych za dalszy przerost adipocytów trzewnych i zwiększona ich reaktywność. Sugeruje się, że poprzez działanie adiponektyny tkanka tłuszczowa obwodowa wywiera przeciwmiażdżycowy efekt, w przeciwieństwie do insuliny, rezystyny i promiażdżycowego działania tkanki tłuszczowej trzewnej. [33, 34]

1.5. Insulinooporność a WKT

Wysokie stężenie WKT w surowicy, które koreluje z ilością tkanki tłuszczowej w organizmie, stanowi istotny czynnik nasilający zmiany metaboliczne. Adipocyty trzewne wykazują zwiększoną odpowiedź na bodźce układu współczulnego, które pobudzają lipolizę, syntezę triglicerydów oraz osłabiają odpowiedź na antylipolityczne działanie insuliny. WKT indukują insulinooporność poprzez zaburzenie prawidłowego funkcjonowania szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału przez insulinę w mięśniach oraz zahamowanie jej supresyjnego działania na glukoneogenezę w wątrobie.

1.6. Uwarunkowania genetyczne ZM

Odkryciem ostatnich lat w zakresie genetyki otyłości i ZM jest gen FTO (fat mass and obesity associated gene). Dla polimorfizmów w pierwszym intronie genu wykazano silny, znamieny związek ze składowymi zespołu metabolicznego. Najprawdopodobniej gen ten odgrywa kluczową rolę w procesie przybierania na wadze poprzez regulację przyjmowania pokarmu, ale także obwodowe działanie na aktywność lipolityczną tkanki tłuszczowej. [35]

Zespół metaboliczny to jednak nie tylko proste współistnienie otyłości brzusznej i insulinooporności z podwyższonym ciśnieniem tętniczym, dyslipidemią czy zaburzeniami gospodarki węglowodanowej. Prowadzi on bowiem nieuchronnie do rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego i cukrzycy typu 2. Podjęcie działań prewencyjnych musi następować jednak na etapie poprzedzającym pojawienie się

objawów klinicznych. Destrukcja ściany naczyniowej rozwija się bowiem już od momentu wystąpienia zaburzeń w obrębie różnych szlaków sygnałowych.

1.7. Rola kompleksu IM w diagnostyce sercowo-naczyniowej

1.7.1. Definicja

W ostatnich latach priorytetem stała się prewencja chorób układu sercowo-naczyniowego, która doprowadzi do redukcji śmiertelności, chorobowości oraz redukcji kosztów leczenia. Prowadzone są ciągle poszukiwania nowych markerów ryzyka sercowo-naczyniowego, które by odzwierciedlały stopień ryzyka sercowo-naczyniowego, szczególnie zwiększonego u pacjentów z zespołem metabolicznym.

Cennym wskaźnikiem zaawansowania miażdżycy jest grubość błony wewnętrznej i środkowej tętnicy szyjnej – IMT (Intima Media Thickness). Wartości IMT pomiędzy 0,9 a 1,5 mm oznaczają pogrubienie błony wewnętrznej i środkowej tętnicy szyjnej, natomiast IMT przekraczającą 1,5 mm traktuje się jako blaszkę miażdżycową.

Zanim rozwinie się objawowa choroba naczyń wieńcowych czy szyjnych dochodzi do rozwoju miażdżycy w ścianie naczynia. Do zwiększenia grubości IM (intima media) i formowania blaszki miażdżycowej dochodzi na długo przed powstaniem istotnych zwężeń. Czasem do rozwoju blaszki miażdżycowej dochodzi już u dzieci i młodych dorosłych, nawet w przypadku braku czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. [36] Określenie grubości kompleksu IM pozwala zdiagnozować chorobę naczyń we wczesnym stadium poprzez bezpośrednią wizualizację naczynia łatwo dostępną, bezpieczną, nieinwazyjną i niedrogą metodą. Zastosowanie metody opisał jako pierwszy Pignoli w 1986 roku. Zdefiniował IMT jako odległość pomiędzy światłem naczynia a płaszczyzną pomiędzy błoną środkową i przydanką. [37] Pignoli i wsp. porównali uzyskany w badaniu ultrasonograficznym w prezentacji dwuwymiarowej obraz ścian aorty brzusznej i tętnicy szyjnej wewnętrznej, z ich budową ocenioną makroskopowo oraz mikroskopowo. Przyjmując, że związany z techniką badania błąd pomiaru wynosi mniej niż 20%, stwierdzili oni w 77% przypadków zgodność obu metod w określeniu grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej. Obecnie ultrasonografia ma potwierdzoną dużą wartość w ocenie IMT.

Publikowane prace różnią się jednak aspektami metodologicznymi. Próbę ujednoczenia zasad pomiaru IMT podjęto w opublikowanym w 2004 roku Mannheim Intima-Media Thickness Consensus. [38] W dokumencie tym podkreślono istotność wykonywania pomiaru w miejscu wolnym od blaszek miażdżycowych, przy możliwie dobrej jakości obrazu kompleksu intima-media. Choć powyższy dokument dopuszcza wykonywanie pomiaru zarówno w zakresie tętnicy szyjnej wspólnej, jak i opuszki oraz początkowym odcinku tętnicy szyjnej wewnętrznej, to wskazuje, że wiarygodna ocena IMT u niemal każdego pacjenta jest możliwa jedynie w obrębie tętnicy szyjnej wspólnej (CCA – Common Carotid Artery). Najlepiej w obrębie dystalnych 2 cm, tuż za rozwidleniem. Za wyborem tego odcinka przemawia fakt, iż zwykle umiejscowiony jest powierzchownie, biegnie równolegle do powierzchni skóry i stosunkowo rzadko w tym regionie tworzą się blaszki miażdżycowe. Podkreślono również zasadność wykonywania pomiaru w obrębie ściany dalszej względem głowicy, wskazując, że wartości pomiarów uzyskiwane w ścianie bliższej są mniej wiarygodne oraz zależą od wzmocnienia obrazu ultrasonograficznego.

Wielokrotnie potwierdzano, że IMT jest cennym wskaźnikiem ryzyka wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego. [39, 40]

1.7.2. IMT a miażdżycza

Znaczenie dla określenia wartości prognostycznej kompleksu IMT mają badania prospektywne. Wyniki metaanalizy dokonanej przez Lorenza i wsp. badających powiązanie IMT i chorób sercowo-naczyniowych wykazały zwiększoną częstość zawału serca (o 10-15%) oraz udaru mózgu (o 13-18%) na każde zwiększenie grubości IMT o 0,1 mm. [41]

W badaniu przeprowadzonym przez Novo i wsp. u 454 pacjentów bez objawów choroby sercowo-naczyniowej, u których określono globalne ryzyko sercowo-naczyniowe poniżej 20% w skali *Progetto Cuore*, oceniano w okresie 5 letniej obserwacji częstość zdarzeń sercowo-naczyniowych. W grupie osób z prawidłowym obrazem ultrasonograficznym tętnic szyjnych częstość ta wyniosła 8%, w grupie ze zwiększoną wartością IMT 13%, natomiast w grupie z bezobjawowymi blaszkami miażdżycowymi 15%. [42]

Kolejna metaanaliza potwierdza wartość prognostyczną IMT dla zdarzeń sercowo-naczyniowych z nieznaczną przewagą, gdy punktem końcowym jest udar mózgu, a także dla zawału serca. [41]

Obserwacje te potwierdza kolejne badanie na grupie 5163 Szwedów (kobiet i mężczyzn), u których oceniano grubość kompleksu IMT, obecność blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych i obserwowano podczas 7 letniego okresu częstość wystąpienia udaru mózgu. Nawet u osób bez blaszek miażdżycowych grubość IM korelowała z częstością udaru mózgu. [43]

Związek IMT z incydentami zawału serca lub udaru mózgu u osób bez choroby sercowo-naczyniowej w wywiadzie potwierdzono również u osób po 65 roku życia. 5858 pacjentów poddano 6-letniej obserwacji. Związek pomiędzy zdarzeniami sercowo-naczyniowymi a grubością kompleksu IM pozostał znaczący również po uwzględnieniu obecności „tradycyjnych” czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. [44]

Wskaźnik IMT pozwala lepiej i bardziej precyzyjnie klasyfikować ryzyko sercowo-naczyniowe. Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego (ESH, European Society of Hypertension) i Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ESC, European Society of Cardiology) zalecają pomiar IMT u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, określając wartość przekraczającą 0,9 mm jako wyraz uszkodzenia narządowego. [45]

1.8. Osteoprotegeryna

Prowadzone na przestrzeni ostatnich lat poszukiwania nowych czynników obrazujących zagrożenie rozwojem chorób układu sercowo-naczyniowego skoncentrowały się między innymi na osteoprotegerynie (OPG)

1.8.1. Odkrycie i kierunki badań nad osteoprotegeryną

Tkanka kostna i układ szkieletowy spełniają w organizmie ludzkim wiele funkcji: chronią ważne życiowo organy, zawierają szpik kostny, stanowią strukturalny szkielet dla mięśni, są także źródłem jonów, takich jak wapń i czynników wzrostu. Szkielet dorosłego człowieka, w odpowiedzi na różne czynniki stymulujące ulega ciągłej przebudowie. [46] Pomiary obrotu kostnego wykazują, że nawet rocznie w warunkach fizjologicznych około 10% tkanki kostnej zbitej i 15-30% (bardziej podatnej na wpływy czynników wewnętrznych i zewnętrznych) tkanki kostnej gąbczastej podlega wymianie, co oznacza, że w ciągu 3 – 10 lat składniki kości są wymieniane w 100%. [47] Wymianę składników kości w okresie wzrostu określa się mianem modelowania. Natomiast po zakończeniu wzrostu i osiągnięciu około 30. roku życia, tzw. szczytowej masy tkanki kostnej, w organizmie człowieka nad modelowaniem zaczyna przeważać proces wewnętrznej przebudowy kości. Proces ten warunkuje jej właściwości regeneracyjne (gojenie złamań, przebudowę przeszczepów). Modelowanie i przebudowa opierają się na cyklicznie następujących po sobie procesach resorpcji i kościotworzenia. Kierowane są przez dwa typy komórek o przeciwstawnym działaniu. Osteoblasty są komórkami budującymi kość, osteoklasty natomiast odpowiadają za destrukcję kości. W przypadku wzmożenia procesu resorpcji lub zahamowania procesu osteogenezy dochodzi do utraty masy kości i rozwoju osteoporozy. Odwrotnie, brak resorpcji prowadzi natomiast do patologicznego zwiększenia masy tkanki kostnej – osteopetrozy.

Wzrost tempa przebudowy tkanki kostnej jest objawem wielu chorób o różnej etiologii: osteoporozy pomenopauzalnej, nadczynności przytarczyc, reumatoidalnego zapalenia stawów, w których miejscowe czy układowe zaburzenia w poziomach stężeń hormonów czy prozapalnych cytokin stymulują resorpcję kości.

Zmniejszająca się masa kostna wraz z upośledzoną architekturą kości prowadzą do zwiększonej podatności na złamania, co prowadzi do obniżenia jakości życia chorych i podwyższonej śmiertelności na skutek powikłań. Leczenie chorób związanych z utratą tkanki kostnej wymaga ogromnych nakładów finansowych. Dlatego też poszukiwanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie i aktywację osteoklastów stało się celem wielu badań naukowych ostatnich lat.

Pierwszym sukcesem było ustalenie pochodzenia osteoklastów, co stworzyło możliwość ich izolacji i hodowli. Prekursorami osteoklastów są hematopoetyczne komórki szpiku linii monocytarno-makrofagowej. Komórki prekursorowe osteoklastów napływają do kości z krążenia, przeważnie z sąsiadującej tkanki łącznej, co stanowi pierwszy etap ich dojrzewania. Kolejne etapy to różnicowanie do jednojądrzastego osteoklastu, fuzja osteoklastów jednojądrzastych i utworzenie aktywnej formy wielojądrzastej. [48]

Rozpoczęto więc pozyskiwanie prekursorów osteoklastów (Osteoclast Precursors, OCPs) ze szpiku kostnego i śledziona, które w obecności czynnika pobudzającego kolonie makrofagów (Macrophage Colony-Stimulating Factor M-CSF) rozpoczynały różnicowanie w dojrzałe formy osteoklastów. Rola M-CSF w tym procesie została ustalona na podstawie obserwacji myszy, które nie wytwarzały aktywnej formy M-CSF – u zwierząt tych rozwinęła się osteopetroza na skutek braku osteoklastów. [49] Jednak w obecności samego M-CSF ukończenie procesu dojrzewania osteoklastów okazało się niemożliwe. Wtedy to Martin i Rodan zaproponowali nową hipotezę, zgodnie z którą to osteoblasty odgrywają główną rolę w dojrzewaniu osteoklastów. Tak więc od 1981 roku wielu badaczy podjęło próbę identyfikacji czynnika aktywującego osteoklasty, który umożliwiłby dokończenie procesu różnicowania rozpoczętego w obecności M-CSF.

System sygnałowy RANKL/OPG/RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand/Osteoprotegerin/ Receptor Activator of Nuclear Factor κ B – Ligand receptorowego aktywatora czynnika jądrowego κ B/Osteoprotegeryna/Receptorowy aktywator czynnika jądrowego κ B) został odkryty przez niezależne grupy badaczy.

Simonet i wsp. [50] odkryli naturalny inhibitor RANKL, cząsteczkę którą nazwali osteoprotegeryną (OPG) ze względu na jej właściwości chroniące kość. Prowadzili oni badania nad myszami transgenicznymi z nadekspresją cDNA (komplementarny DNA) różnych receptorów TNF (Tumor Necrosis Factor - czynnik martwicy

nowotworów). Zaobserwowali rozwój osteopetrozy u myszy z nadekspresją genu kodującego OPG. [50]

Tsuda i wsp. donieśli o odkryciu identycznej cząsteczki ekstrahując czynnik, który hamował osteoklastogenezę z ludzkich embrionalnych fibroblastów. Otrzymali częściową sekwencję białka, następnie sklonowali cDNA dla OPG. [51, 52, 53]

Używając techniki klonowania obie grupy badaczy zidentyfikowały również ligand OPG i odpowiednio czynnik różnicowania osteoklastów. [54, 55] Wkrótce okazało się iż zidentyfikowana cząsteczka jest identyczna z jednym z ligandów rodziny receptorów TNF, nazwanym wcześniej RANKL. [56] Natomiast zidentyfikowany komórkowy receptor okazał się identyczny z wcześniej zidentyfikowanym RANK odkrytym przez Andersona i wsp.. Anderson dokonał odkrycia podczas sekwencjonowania cDNA komórek dendrytycznych ludzkiego szpiku kostnego. [56]

RANKL jest białkiem w postaci homotrimeru związanym z błoną komórkową osteoblastów i aktywowanych limfocytów T lub jest wydzielany przez aktywowane limfocyty T. RANKL jest obecny ponadto w węzłach chłonnych, grasicy, gruczołach sutkowych, tkance płucnej, w mniejszych stężeniach w śledzionie, szpiku kostnym i wielu innych tkankach.

RANK jest białkiem śródbłonowym, również homotrimerem, jego ekspresję obserwuje się na OCPs, osteoklastach i komórkach dendrytycznych. Także spotykany jest w gruczołach sutkowych i niektórych komórkach nowotworowych z dużym potencjałem przerzutów do kości (rak gruczołu sutkowego, rak prostaty).

Osteoprotegeryna jest glikoproteiną należącą do rodziny receptorów TNF (podobnie jak RANKL i RANK), choć nie posiada domeny śródbłonkowej i funkcjonuje jako rozpuszczalne białko poza komórką. Wydzielana jest przede wszystkim przez osteoblasty, ponadto jej ekspresję stwierdzono w sercu, nerkach, wątrobie, śledzionie, szpiku kostnym. [46]

Syntetyzowana jest w postaci propeptydu (401 aminokwasów), z którego po odłączeniu krótkiego 21-aminokwasowego peptydu sygnałowego powstaje dojrzałe białko (380 aminokwasów). OPG w formie dojrzałej występuje w postaci homodimeru, jego powstanie zależy od obecności disiarczkowych wiązań kowalencyjnych między resztami cysteinowymi w pozycji 400 łańcucha aminokwasowego. Pomimo mutacji punktowej, powodującej zamianę cysteiny (Cys-400) w serynę (Ser-400) białko to zachowuje nadal swoją aktywność biologiczną, co wskazuje na brak zależności między dimeryzacją a aktywnością. [52] OPG

zbudowana jest z 7 domen. Częsteczką ta zawiera w N-koncowym fragmencie 4 domeny (D1-D4) bogate w cysteinę, które wiążąc ligand warunkują aktywność OPG jako inhibitora osteoklastogenezy. Fragment C-końcowy zawiera 2 regiony (D5-D6) homologiczne z domenami śmierci, regiony te zostały określone mianem cytoplazmatycznych mediatorów apoptozy. W C-końcowym fragmencie łańcucha aminokwasowego występuje także domena (D7) wiążąca heparynę i nadająca cząsteczce ładunek dodatni, odpowiedzialna za interakcje z proteoglikanami. [57] U człowieka gen OPG zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 8q23,24. Stanowi on pojedynczą kopię składającą się z 5 eksonów. [58] Ekspresja tego genu rozpoczyna się bardzo wcześnie, między 8 a 9 dniem embriogenezy.

OPG wpływa na obrót kostny poprzez układ OPG/RANK/RANKL. Osteoblasty są komórkami zaangażowanymi w tworzenie tkanki kostnej, osteoklasty w jej resorpcję. RANKL jako białko przezłonowe osteoblastów, łączy się ze swoim receptorem RANK na powierzchni OCPs i osteoklastów. Skutkiem tego jest wiele szlaków sygnałowych wewnątrzkomórkowych prowadzących do formowania, różnicowania i aktywacji osteoklastów, a co za tym idzie resorpcji kości. [59] Początkowo interakcja RANKL-RANK powoduje przyciągnięcie czynników związanych z receptorem TNF w okolicę wewnątrzkomórkowej domeny RANK. Za aktywność resorpcyjną osteoklastów odpowiedzialne jest białko TRAF 6 (TNF receptor associated factor 6 – czynnik 6 związany z receptorem TNF). [60] Czynniki transkrypcyjny NF κB, także p38 i JNK – kinazy białkowe aktywowane mitogenem (MAPKs) odpowiedzialne są za różnicowanie osteoklastów. [61, 62, 63] Ponadto uruchamiany jest szlak P13K/Akt/mTOR i pozakomórkowa MAPK (ERK), które mogą odgrywać rolę w przeżyciu osteoklastu. [64, 65] Równowaga procesów formowania i resorpcji kości zapewniona jest poprzez blokowanie interakcji RANKL/RANK przez OPG. OPG produkowana przez osteoblasty działa jako receptor pułapka, wiąże się jako homodimer z homotrimerem RANKL, uniemożliwiając tym samym jego połączenie się z RANK (i blokując aktywację osteoklastów). W rezultacie proces resorpcji kości zostaje zahamowany.

Poza regulacją metabolizmu kości OPG bierze także udział w przeżyciu komórki poprzez oddziaływanie jako receptor dla TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand - ligand indukujący apoptozę zależną od czynnika martwicy nowotworu). [66] TRAIL produkowany jest przez komórki immunologiczne (np. monocyty) np. w otoczeniu komórek guza. OPG działa jako fałszywy receptor, wiążąc TRAIL,

uniemożliwia jego interakcję z receptorami apoptozy, powodując, że komórka unika tym samym śmierci. [67]

OPG odgrywa także rolę w fizjologicznej i patofizjologicznej regulacji układu immunologicznego. Dojrzałe komórki dendrytyczne (DCs – dendritic cells) prezentują antygeny limfocytom T, interakcja pomiędzy RANKL pochodzącym z limfocytów T z RANK na powierzchni DCs prowadzi do aktywacji wielu szlaków sygnałowych, przeżycia DCs i zwiększenia liczby limfocytów T. Dlatego też spekuluje się, że OPG hamuje odpowiedź immunologiczną poprzez blokowanie interakcji RANK/RANKL, zmniejszając tym samym liczbę komórek DCs (pośrednio przyczynia się więc do ich śmierci). [53, 68]

1.8.2. Osteoprotegeryna w układzie sercowo-naczyniowym

OPG obecna jest także w tkankach układu sercowo-naczyniowego, sercu, tętnicach i żyłach, na poziomie komórkowym w komórkach śródbłonka (ECs – Endothelial Cells) i mięśni gładkich naczyń (VSMCs – Vascular Smooth Muscle Cells). [69] OPG zlokalizowana jest w komórkach śródbłonka w ziarnistościach wydzielniczych zwanych WPB (Weibel-Palade Bodies) razem z glikoproteiną vWF (von Willebrand factor – czynnik von Willebranda) i molekułą adhezyjną P-selectin (selektyna P). [70]

RANKL produkowany przez ECs i VSMCs wiąże się z RANK na powierzchni ECs i w ten sposób może brać udział w procesie aterogenezy poprzez szlaki metaboliczne, które nadal są badane. Natomiast wiadomo, że bierze udział w procesie kalcyfikacji VSMCs poprzez uruchomienie produkcji białka morfogenetycznego kości 4 - BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) w tych komórkach. Proces ten hamowany jest przez OPG. [71] Jakkolwiek wiadomo, że wpływ OPG na komórki naczyń krwionośnych jest bardziej skomplikowany i podlega wielu procesom regulacyjnym.

Rozważane są nadal różne hipotezy wpływu OPG na komórki układu sercowo-naczyniowego. OPG sprzyja przeżyciu komórek śródbłonka, lecz mechanizm tego zjawiska nie został dokładnie poznany. [72] Być może odpowiedzialne za to jest wiązanie OPG z receptorem TRAIL (potencjalny aktywator apoptozy) na VSMCs. TRAIL pobudzany w cukrzycy, hiperlipidemii, przewlekłej niewydolności nerek czy miażdżycy prowadzi do śmierci komórek. OPG może wpływać na procesy metaboliczne toczące się w ścianach naczyń krwionośnych poprzez hamowanie

apoptozy komórek mięśni gładkich naczyń, indukowanej poprzez TRAIL. [66] Nie są poznane prawdopodobnie wszystkie szlaki sygnałowe poprzez które oddziałuje OPG. Odkryto ostatnio aktywność domeny OPG wiążącej heparynę, która wiążąc się z komórkami śródbłonna powoduje adhezję leukocytów (potencjalnie proaterogenny efekt). [73] Na ekspresję OPG w komórkach mięśni gładkich wpływ mają liczne czynniki wzrostu i cytokiny, włączając: TNF α , IL-1 β , bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), angiotensyna II. [74, 75] W komórkach śródbłonna ekspresję OPG zwiększają: TNF α , IL-1 α i IL-1 β , aktywowana integryna $\alpha_v\beta_3$, *Porphyromonas gingivalis* (patogen chorób przyzębia). [76] Badania in vitro potwierdziły zdolność cytokin prozapalnych do zwiększania poziomu OPG w komórkach śródbłonna i mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Odkrycia te sugerować mogą udział OPG w chorobach układu sercowo-naczyniowego, odkąd czynniki prozapalne uważane są za kluczowe w rozwoju choroby wieńcowej i miażdżycy innych tętnic. Nadal jednak nie wiadomo czy OPG przyczynia się do rozwoju czy chroni przed miażdżycą?

1.8.3. Modele zwierzęce

Obserwacje in vivo prowadzone na zwierzętach potwierdzają również udział OPG w metabolizmie tkanki kostnej i patofizjologii chorób związanych z układem kostno-szkieletowym. Fizjologiczna rola OPG została zbadana poprzez przeprowadzenie doświadczeń z myszami pozbawionymi genu kodującego OPG. Dorastające i dorosłe osobniki prezentowały ciężką osteoporozę, ścieńczenie kości płaskich czaszki oraz częste złamania. OPG okazała się istotnym regulatorem w tworzeniu masy kostnej. Nieoczekiwanie u myszy pozbawionych genu OPG stwierdzono także uwapnienie błony środkowej aorty i tętnic nerkowych. Zasugerowało to związek szlaków sygnałowych prowadzących do osteoporozy i kalcyfikacji naczyń krwionośnych. [77]

Odkrycia te zostały potwierdzone poprzez obserwację myszy pozbawionych genu OPG, którym podano OPG. Osteoporoza u tych zwierząt została skutecznie wyleczona. Natomiast podawanie OPG nie zlikwidowało już rozwiniętej kalcyfikacji błony środkowej aorty i tętnic nerkowych. Jedynie podanie OPG w okresie ciąży chroniło zwierzęta przed kalcyfikacją tętnic. [78] Rola OPG w zapobieganiu

kalcyfikacji naczyń krwionośnych potwierdzona została także w badaniach, w których podawana zwierzętom OPG hamowała kalcyfikację naczyń krwionośnych, indukowaną podawaniem warfaryny czy witaminy D. Badacze sugerują dwa mechanizmy naczynioprotekcyjnego oddziaływania OPG: poprzez ograniczenie resorpcji kości oraz poprzez bezpośredni wpływ na ekspresję inhibitorów kalcyfikacji (np. MGP – Matrix Gla Protein) w komórkach naczyń krwionośnych. [79] Obserwacje ostatnich lat wskazują na powiązanie stężenia OPG z chorobą wieńcową czy miażdżycą innych tętnic. Nadal jest jednak mało danych na temat bezpośredniej roli OPG w procesie miażdżycowego uszkodzenia tętnic. Żeby ocenić wpływ OPG na kalcyfikację i progresję rozwoju blaszek miażdżycowych przeprowadzono badania na myszach pozbawionych genu apolipoproteiny E ($apoE^{-/-}$). Badanie potwierdziło hipotezę, że brak OPG prowadzi do powstania większych zmian miażdżycowych i szybszej ich kalcyfikacji. [80]

W badaniu Orita i wsp. wykazano, że kalcyfikacja ta nie była związana z apoptozą czy infiltracją makrofagami. U myszy pozbawionych genu OPG dochodziło do kalcyfikacji błony środkowej aorty. Mikroskopia elektronowa wykazała depozyty wapnia w cytoplaźmie i przestrzeni pozakomórkowej mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Nie obserwowano natomiast apoptozy tych komórek, ani nacieczenia makrofagami błony środkowej. W miejscach kalcyfikacji wykazano natomiast zwiększone stężenie fosfatazy zasadowej. Sugeruje to możliwy protekcyjny wpływ OPG poprzez zmniejszanie aktywacji fosfatazy zasadowej. [81]

Badania na zwierzętach sugerują, że OPG może mieć wpływ jedynie na kalcyfikację tętnic, nie na rozwój blaszek miażdżycowych. Myszom pozbawionym genu dla receptora LDL (low density lipoprotein) ($LDLR^{-/-}$), karmionym dietą wysokotłuszczową, podawano OPG lub placebo. U zwierząt pozbawionych leczenia obserwowano rozwój miażdżycy z kalcyfikacją blaszek miażdżycowych, oraz wzrost stężenia endogennej OPG. Natomiast u zwierząt leczonych OPG obserwowano taki sam postęp rozwoju zmian miażdżycowych, zredukowana została jedynie ich kalcyfikacja. [82]

Być może OPG w układzie krwionośnym jest jedynie inhibitorem kalcyfikacji i markerem miażdżycy, nie jej mediatorem? Być może nie można przenieść wniosków z doświadczeń nad zwierzętami na pole patofizjologii ludzkiego ciała?

1.8.4. Osteoprotegeryna w badaniach *in vivo*

Wiele badań prowadzonych *in vivo* potwierdza rolę OPG w regulacji metabolizmu tkanki kostnej. Podawanie OPG w pojedynczej dawce kobietom po menopauzie powodowało zredukowanie obrotu kostnego. [83] Podobnie podawanie rekombinowanej OPG (AMGN-0007) chorym na szpiczaka mnogiego czy raka piersi powodowało zahamowanie resorpcji kości. [84] Żadna z przedstawionych w powyższych badaniach protein nie przeszła jednak do dalszych badań, prawdopodobnie ze względu na możliwość rozwoju odpowiedzi immunologicznej na podawane proteiny i rozwoju niepożądanych efektów ze strony układu immunologicznego.

Badania skupiły się na w pełni ludzkim monoklonalnym przeciwciele przeciwko RANKL o nazwie Denosumab. Mechanizm działania Denosumabu pozostaje podobny do działania OPG, jednak jego okres półtrwania jest znacznie dłuższy i dłuższy efekt redukcji markerów resorpcji kości. [85] Bezpieczeństwo oraz skuteczność długoterminowa (6-letnia terapia) Denosumabu została potwierdzona w badaniach klinicznych u kobiet z osteoporozą pomenopauzalną. [86] Obecnie Denosumab jest powszechnie dostępnym lekiem.

1.8.5. Osteoprotegeryna a choroby układu sercowo-naczyniowego

Doniesienia o kalcyfikacji aorty i tętnic nerkowych u myszy pozbawionych OPG zapoczątkowały poszukiwania potencjalnej roli OPG w chorobach układu sercowo-naczyniowego również u ludzi. Badania epidemiologiczne wykazują, że osteoporoza i miażdżyca mogą być powiązane. [87]

Rozpoczęto więc poszukiwania zależności pomiędzy OPG a chorobami układu sercowo-naczyniowego. W jednym z badań przedstawiono zależność pomiędzy zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym i polimorfizmem genu OPG. [88] W kolejnym badaniu zamiana tyminy na cytozynę w pozycji 950 genu OPG okazała się być związana ze zwiększeniem grubości kompleksu IMT tętnicy szyjnej wspólnej, jako wskaźnikiem wczesnej miażdżycy u osób z nadciśnieniem tętniczym. [89] Obserwacje te sugerować mogą, że zazwyczaj OPG w procesie tworzenia miażdżycy odgrywa ochronną rolę na naczynia krwionośne, a polimorfizm genu OPG upośledza jej funkcję. [88]

Zdania badaczy są jednak podzielone. Ustalono w wielu badaniach, że wzrost stężenia OPG koreluje z obecnością choroby wieńcowej i jej zaawansowaniem. Jono i wsp. badali stężenie OPG u 201 pacjentów, u których wykonywano koronarografię z powodu dławicy piersiowej stabilnej. Stężenia OPG były znacząco wyższe u pacjentów z istotną stenozą w tętnicach wieńcowych w porównaniu z pacjentami, u których istotnej stenozy nie stwierdzono. Analiza wykazała również iż wzrost stężenia OPG zależny był od liczby zajętych naczyń wieńcowych. Zebrane dane sugerują więc udział OPG w progresji choroby wieńcowej. [90] Podobne wyniki uzyskał Schoppet i wsp. na grupie 522 mężczyzn. Wykazał dodatnią korelację stężenia OPG z ciężkością choroby wieńcowej, obrazowaną poprzez liczbę zajętych przez istotne zmiany miażdżycowe naczyń wieńcowych. [91] Palazzuoli i wsp. badali również pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (OZW: dławicą piersiową niestabilną i zawałem serca bez uniesienia odcinka ST). Na grupie 178 badanych wykazali zwiększenie stężenia OPG u pacjentów z OZW w porównaniu z pacjentami z dławicą piersiową stabilną, oraz również dodatnią korelację pomiędzy stężeniem OPG a liczbą uwidocznionych blaszek miażdżycowych. [92] Podobne wyniki uzyskano oznaczając stężenie OPG i CRP u pacjentów z chorobą wieńcową. Poziom OPG okazał się zależny od zaawansowania choroby wieńcowej; był znacząco wyższy u pacjentów ze zmianami miażdżycowymi w trzech tętnicach wieńcowych niż u pacjentów ze zwężeniem jednej tętnicy. Wykazano również dodatnią korelację OPG i białka CRP, stanowiącego uznany marker wzrostu ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. [93]

Poziom stężenia OPG związany jest z obecnością miażdżycy w tętnicach wieńcowych i jej zaawansowaniem, co potwierdzają wciąż nowe obserwacje. Ren i wsp. badali nie tylko stężenia OPG w surowicy, lecz również ekspresję mRNA dla OPG w aorcie chorych z chorobą wieńcową. Ekspresja ta była większa u pacjentów z niestabilną chorobą wieńcową i w obrębie niestabilnych blaszek miażdżycowych. [94] Również stężenia miejscowe OPG w obrębie usuniętych blaszek miażdżycowych z tętnic szyjnych pacjentów z objawami miażdżycy były wyższe niż u pacjentów bezobjawowych. [95] Poziom stężenia OPG u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym okazał się również dobrym predyktorem długoterminowej śmiertelności i rozwoju niewydolności serca. Wykazano to w badaniu 897 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym. Podwyższony poziom OPG był niezależnym czynnikiem ryzyka zwiększonej śmiertelności w ostrym zespole wieńcowym. Wykazano także

korelację stężeń OPG z częstością przyszłych hospitalizacji z powodu niewydolności serca. [96]

Również miażdżyca tętnic obwodowych wiąże się ze wzrostem stężeń OPG, a jej stężenia są jeszcze wyższe w przypadku obecności owrzodzeń o etiologii niedokrwiennej. Fakt ten potwierdzają obserwacje Zieglera i wsp. na grupie 67 chorych poddawanych przezskórnej angioplastyce z powodu zaawansowanej, objawowej miażdżycy tętnic kończyn dolnych. Wspomniani badacze spostrzegli dodatnią korelację stężenia OPG z zaawansowaniem choroby. [97]

Kolejnym powikłaniem miażdżycy, które również związane jest z podwyższeniem stężenia OPG jest udar niedokrwienny mózgu. Przebadano 51 pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu. Stężenia OPG były wyższe u pacjentów z udarem niedokrwiennym w przypadku rozpoznania choroby dużych naczyń. [98] W innym badaniu, na 244 pacjentach z udarem niedokrwiennym mózgu, również stężenie OPG okazało się predyktorem śmiertelności u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu. [99] Związek OPG z częstością udaru niedokrwiennego ma jednak charakter kontrowersyjny. Badania Nybo i wsp. nie potwierdzają zależności pomiędzy stężeniami OPG a ryzykiem udaru niedokrwiennego mózgu w zdrowej populacji. Badane poziomy OPG u 254 zdrowych osób, u których w okresie trzyletniej obserwacji wystąpił epizod udaru niedokrwiennego mózgu nie wykazały znamienych różnic z grupą kontrolną. [100]

Podwyższone stężenia OPG towarzyszą również miażdżycy na etapie subklinicznym. W badaniu, w którym uczestniczyło ponad 2000 osób, określano stopień uwapnienia tętnic wieńcowych oraz obecność blaszek miażdżycowych w aorcie, wykazując zwiększenie stężenia OPG już na tym etapie zaawansowania miażdżycy. Co więcej, zwiększenie stężenia OPG okazało się istotnie statystycznie wyższe także po uwzględnieniu wieku, płci, palenia tytoniu, cukrzycy, hiperlipidemii i obciążonego wywiadu rodzinnego. [101]

Wykazano również, że OPG obrazuje ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych u zdrowych mężczyzn i kobiet, niezależnie od klasycznych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego. 951 zdrowych pacjentów, u których w 6 letniej obserwacji w trakcie badania EPIC-Norfolk (the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) doszło do hospitalizacji lub zgonu z powodu choroby wieńcowej porównywano z grupą kontrolną. Wyjściowe stężenia OPG u tych pacjentów okazały się wyższe, i niezależne od klasycznych czynników ryzyka. [102]

Korelację stężenia OPG z ryzykiem rozwoju choroby sercowo-naczyniowej i śmiertelności ogólnej wykazano także w badaniu the Framingham Heart Study na grupie 3250 osób w niemalże 5-letniej okresie czasu. [103]

Podobne obserwacje poczyniono w badaniu the Thromsø Study na grupie 6265 uczestników bez wywiadu o przebytych zawałach serca i udarach mózgu. Wykazano dodatnią korelację stężenia OPG z ryzykiem zawału serca, niedokrwionego udaru mózgu, całkowitą śmiertelnością, zgonem z powodu choroby wieńcowej czy udaru oraz zgonem z jakiegokolwiek przyczyny. Korelacja ta okazała się niezależna od wieku, płci, skurczowego ciśnienia tętniczego, BMI, stężenia cholesterolu HDL, cholesterolu całkowitego, kreatyniny, CRP czy rozpoznania cukrzycy. [104]

Zebrane, w przeprowadzonych dotąd badaniach, dowody przemawiają silnie za związkiem OPG z patologią chorób układu sercowo-naczyniowego. Być może OPG jest dobrym markerem miażdżycy. Chociaż nie ustalono dotąd czy bierze ona udział w rozwoju czy zapobiega miażdżycy.

Ponieważ jednak OPG wydaje się odgrywać istotną rolę w patofizjologicznych mechanizmach zachodzących na poziomie naczyń krwionośnych, konieczne są dalsze badania, które ustalą szlaki patofizjologiczne, w których uczestniczy OPG. Rozważane jest także znaczenie OPG jako celu terapeutycznego.

2. Cel pracy:

- Ocena stężenia osteoprotegeryny (OPG) u osób z zespołem metabolicznym (ZM),
- Poszukiwanie zależności stężenia OPG z parametrami antropometrycznymi, gospodarką lipidową, insulinoopornością oraz grubością kompleksu IM u osób z ZM,
- Oszacowanie obecności przewlekłego stanu zapalnego w ZM i ocena jego związku ze stężeniem OPG oraz grubością kompleksu IM.

3. Materiał i metody

3.1. Badana populacja

Protokół badania uzyskał zgodę Terenowej Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (uchwała nr 190/10). Wszyscy pacjenci uzyskali pisemną informację o celu i zasadach badania.

Badaniem objęto chorych z Kliniki Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego oraz Przyklinicznej Poradni Zaburzeń Metabolicznych. Okres rekrutacji rozpoczął się w marcu 2010 roku, a zakończył się w maju 2011 roku.

Kryteria włączenia do badania:

1. Rozpoznanie ZM wg kryteriów przedstawionych przez grupę konsultacyjną International Diabetes Federation (IDF) w czerwcu 2005 r..
2. Wiek 18-65 lat,
3. Podpisanie formularza świadomej zgody na udział w badaniu.

Kryteria wykluczenia z badania:

- Ciąża,
- Choroba nowotworowa,
- Ostry i przewlekły jawny klinicznie stan zapalny,
- Ostra infekcja w ostatnim miesiącu,

- Wtórna postać otyłości, nadciśnienia tętniczego, ciężkie dyslipidemie rodzinne,
- Niewydolność serca,
- Choroba niedokrwienności serca (wykluczona w oparciu o wywiad i próbę wysiłkową),
- Choroby naczyń obwodowych (tętnic szyjnych, kręgowych lub tętnic kończyn dolnych),
- Zaburzona funkcja nerek (stężenie kreatyniny w osoczu > 115 $\mu\text{mol/L}$),
- Zaburzona funkcja wątroby (aktywność transaminaz 3-krotnie przekraczająca zakresy wartości referencyjnych),
- Cukrzyca (wykluczona na podstawie doustnego testu obciążenia glukozą),
- Inne zaburzenia, które mogłyby stanowić jakiekolwiek ryzyko dla pacjenta podczas przeprowadzania badania,
- Osteoporoza (na podstawie wywiadu).

Do badania włączono ostatecznie 70 chorych z zespołem metabolicznym oraz 20 zdrowych ochotników.

Grupę badaną stanowiło 70 chorych z zespołem metabolicznym (34 kobiety i 36 mężczyzn), wiek $52,7 \pm 11,6$ lat, BMI $35,7 \pm 6,4$ kg/m^2 .

Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników (10 kobiet i 10 mężczyzn), wiek $48,3 \pm 10,6$ lat, BMI $23,9 \pm 1,9$ kg/m^2 .

Tabela 1. Charakterystyka badanych grup

	grupa badana	grupa kontrolna
n	70	20
wiek (lata)	$52,7 \pm 11,6$	$48,3 \pm 10,6$
kobiety	34	10
mężczyźni	36	10
BMI (kg/m^2)	$35,7 \pm 6,4$	$23,9 \pm 1,9$

BMI – *Body Mass Index* (wskaźnik masy ciała)

3.2. Metodyka

Po wstępnym zakwalifikowaniu pacjenta do badania na podstawie kryteriów włączenia i wykluczenia, u każdego chorego wykonano omówione poniżej czynności oraz badania.

Badanie podmiotowe

Pytano o objawy lub rozpoznanie takich stanów, jak niewydolność serca, choroba niedokrwienna serca, choroby nerek, choroby wątroby, choroby naczyniowe mózgu, choroby, którym towarzyszy proces zapalny, choroby nowotworowe, osteoporoza, ciąża.

W oparciu o wywiad wykluczono rozpoznanie czy objawy wtórnych przyczyn otyłości, nadciśnienia tętniczego czy ciężkich dyslipidemii rodzinnych.

Analizowano pobierane leki, zwracając uwagę na preparaty mogące modyfikować proces zapalny, m.in. niesterydowe leki przeciwzapalne.

Zwracano uwagę na tryb życia pacjenta, warunki zawodowe, dietę oraz nałogi, zwłaszcza palenie papierosów.

Badanie przedmiotowe

Na podstawie badania przedmiotowego starano się wykluczyć wtórne przyczyny otyłości czy nadciśnienia tętniczego. Poszukiwano również klinicznie jawnych stanów, którym towarzyszy ostry lub przewlekły proces zapalny.

Pomiary antropometryczne

Wykonano pomiar aktualnej masy ciała i wzrostu (w bieliźnie, bez obuwia, rano, na czczo) oraz zmierzono obwód talii (mierzonego w połowie odległości między dolnym brzegiem łuku żebrowego i górnym grzebieniem kości biodrowej) i bioder (mierzonego na wysokości krętarzy większych). Pomiaru masy ciała dokonano na wadze elektronicznej z dokładnością do 0,1 kg. Wzrost oraz obwody talii i bioder określono z dokładnością do 0,5 cm. Otrzymane wartości wykorzystano następnie do obliczenia wskaźników antropometrycznych:

- wskaźnik masy ciała (BMI) obliczono ze wzoru:

$$\text{BMI} = \text{waga [kg]} / (\text{wzrost [m]})^2$$

Za prawidłową masę ciała uznawano wartość BMI < 25 kg/m², między 25–29,9 kg/m² rozpoznawano nadwagę, natomiast jako otyłych klasyfikowano chorych z BMI ≥ 30 kg/m². [105]

- wskaźnik talia/biodro (WHR) obliczono ze wzoru:

$$\text{WHR} = \frac{\text{obwód talii [cm]}}{\text{obwód bioder [cm]}}$$

WHR ≥ 0,85 dla kobiet oraz WHR ≥ 1,0 dla mężczyzn świadczył o brzuszny typie otyłości. Wskaźnik talia:biodra < 0,85 dla kobiet oraz < 1,0 dla mężczyzn przy BMI ≥ 30 kg/m² wskazywał na otyłość pośladkowo-udową. [105]

- U wszystkich badanych metodą bioimpedancji elektrycznej przy użyciu aparatu Bodystat 1500 firmy Bodystat Ltd. oznaczono względną (%FAT) oraz bezwzględną (kgFAT) zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie.

W metodzie tej określana jest oporność poszczególnych tkanek na prąd o małej częstotliwości. Tkanka tłuszczowa, w której zawartość wody jest mała, opóźnia przepływ prądu. Zalety tej metody stanowią: przenośność, relatywnie niski koszt, nieinwazyjny charakter, krótki okres pomiaru, duża wiarygodność testu udowodniona w wielu badaniach. [106]

Pomiar ciśnienia tętniczego

Pomiaru ciśnienia krwi dokonano dwukrotnie (z odstępem minutowym) w pozycji siedzącej przy pomocy sfigomanometru rtęciowego, na ramieniu na którym wcześniej stwierdzano wyższe wartości ciśnienia tętniczego. Przed pomiarem chorzy 5 minut odpoczywali, a przez 30 minut nie pili mocnej herbaty, kawy ani nie palili papierosów. Zastosowano mankiety z poduszką gumową o szerokości 13 cm i długości 30 cm. W przypadku osób z ramionami o obwodzie ≥35 cm stosowano mankiety szersze. Mankiety założono tak, aby jego dolny brzeg znajdował się 3 cm powyżej zgięcia łokciowego. Membrana stetoskopu była przyłożona w okolicy dołu łokciowego, w miejscu maksymalnego tętnienia tętnicy ramiennej. Mankiety wypełniono powietrzem do około 30 mmHg powyżej ciśnienia przy którym zanikło tętno na tętnicy promieniowej. Słupki rtęci w manometrze obniżano z szybkością 2–3 mmHg/s. Pojawienie się tonów Korotkowa (faza I) określało skurczowe ciśnienie tętnicze, ich zniknięcie (faza V) – ciśnienie rozkurczowe. Zarówno skurczowe i rozkurczowe ciśnienie mierzono z dokładnością do 2 mmHg.

Na podstawie średniej wartości ciśnień z dwóch pomiarów obliczono średnie ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe.

Badania laboratoryjne

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

Wykonano następujące oznaczenia:

- Stężenie białka hsCRP (high sensitive C reactive protein - wysokoczułe białko C-reaktywne)

Oznaczenia dokonano za pomocą turbidymetrycznego testu immunologicznego typu particle-enhanced (PETIA), odczytu dokonano przy użyciu aparatu Dimension RxL Max firmy Dade Behring.

- Aktywność AIAT, AspAT – aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej

Do ilościowej oceny transaminaz wykorzystano metodę enzymatyczną. [107]

AIAT katalizuje transaminację alaniny na α -ketoglutaran z wytworzeniem pirogronianu i glutaminianu. Powstały pirogronian reaguje z NADH w obecności dehydrogenazy mleczanowej, w wyniku czego powstaje mleczan i NAD. Spadek absorbancji przy 340 nm związany z utlenieniem NADH jest wprost proporcjonalny do aktywności AIAT-u w próbce.

AspAT katalizuje transaminację z asparaginianu na α -ketoglutaran z wytworzeniem szczawiooctanu i glutaminianu. Powstały szczawiooctan reaguje z NADH w obecności dehydrogenazy jabłczanowej, w wyniku czego powstaje jabłczan i NAD. Spadek absorbancji przy 340 nm związany z utlenieniem NADH jest wprost proporcjonalny do aktywności AspAT-u w próbce.

- Stężenie kreatyniny

Do ilościowej oceny stężenia kreatyniny w surowicy wykorzystano metodę kolorymetryczną Jaffa. [107] Zasada tej metody oparta jest na reakcji kreatyniny z

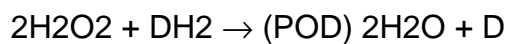
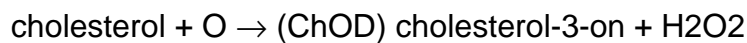
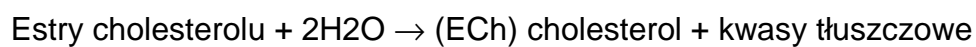
kwasem pikrynowym w środowisku zasadowym, w wyniku czego powstaje barwny kompleks. Wzrost absorbancji (A) jest proporcjonalny do stężenia kreatyniny w badanej próbie. Stężenie kreatyniny wyliczono z wzoru:

$$\text{Kreatynina} = \Delta A \text{ próby badanej} / \Delta A \text{ próby wzorcowej} \times 177$$

- Oznaczenie parametrów gospodarki lipidowej

Oznaczono stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL, cholesterolu frakcji HDL i triglicerydów (TG) metodą enzymatyczną w testach komercyjnych.

Cholesterol całkowity (TCH) oznaczano metodą enzymatyczną z użyciem esterazy cholesterolowej (ECh), oksydazy cholesterolowej (ChOD) oraz peroksydazy (POD):



D – barwnik, którego intensywność jest wprost proporcjonalna do stężenia cholesterolu w surowicy krwi

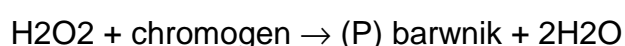
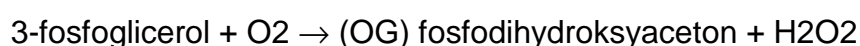
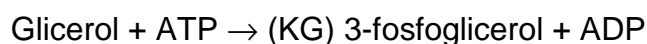
Cholesterol HDL oznaczano metodą bezpośrednią przy użyciu zestawu Cormay HDL-DIRECT. Detergent obecny w odczynniku HDL-DIRECT stabilizuje cząstki lipoproteinowe należące do frakcji chylomikronów, VLDL i LDL, rozkładając równocześnie cząstki lipoprotein HDL. Uwolniony cholesterol frakcji HDL jest następnie oznaczany metodą enzymatyczną jak powyżej.

Stężenie cholesterolu LDL wyliczano ze wzoru Friedewalda: [107]

$$\text{Cholesterol LDL (mmol/l)} = \text{TCH (mmol/l)} - \text{HDL (mmol/l)} - \text{TG (mmol/l)} / 2,2$$

Wzór ten był wykorzystywany, gdy wartość TG wynosiła < 4,6 mmol/l

Stężenie triglicerydów (TG) w surowicy oznaczano metodą enzymatyczną w świetle widzialnym z wykorzystaniem lipazy (L), kinazy glicerolowej (KG), oksydazy 3-fosfoglicerolowej (OG) i peroksydazy (P): [107]



Intensywność powstałego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia triglicerydów.

Wartości referencyjne:

Cholesterol całkowity 3,62–5,20 mmol/l

HDL-cholesterol 0,90–1,81 mmol/l

LDL-cholesterol 2,20–3,62 mmol/l

Triglicerydy 0,68–1,88 mmol/l

- Oznaczenie stężenia glukozy

Glukozę oznaczano w osoczu krwi żyłnej metodą enzymatyczną z użyciem oksydazy glukozowej (OG) i peroksydazy (P). [105]

Glukoza + H₂O₂ + O₂ → (OG) H₂O + kwas glukonowy

H₂O₂ + DH₂ → (P) 2H₂O + D

D – barwnik, którego intensywność jest wprost proporcjonalna do stężenia glukozy

Resztę krwi, pobranej na skrzep, odwirowano z szybkością 10000 obrotów/min, w temperaturze 4°C, przez 15 minut. Zabezpieczono 2 jedno-mililitrowe próbki surowicy, które zamrożono w temperaturze -20°C do czasu wykonywania oznaczenia stężenia osteoprotegeryny i insuliny.

- Stężenie insuliny i insulinooporność

Pomiaru stężenia insuliny (INS) dokonano metodą radioimmunometryczną (RIA), która oparta jest na tworzeniu się kompleksu antygen-przeciwciała. W metodzie tej występują dwa rodzaje antygenów. Jednym z nich jest ludzka insulina znakowana izotopem promieniotwórczym J125. Drugim antygenem wolnym od znacznika radioaktywnego jest odpowiednia substancja badana znajdująca się w surowicy pacjenta.

W trakcie wykonywania oznaczenia do prób badanych zawierających nie znakowaną substancję dodawany jest znakowany antygen. Oba rodzaje antygenów konkurują o ograniczoną liczbę miejsc wiązania na cząsteczce przeciwciała. Im większe stężenie antygeny nie znakowanego, tym mniej antygeny znakowanego jodem wiąże się z przeciwciałem. Po przepłukaniu radioaktywność związana z próbką odzwierciedla stężenie badanego antygeny.

Oznaczenie stężenia insuliny oraz określenie wskaźnika insulinooporności

Insulina oznaczona została przy użyciu zestawu radioimmunometrycznego RIA-INS wyprodukowanego przez Ośrodek Badawczo – Rozwojowy Izotopów POLATOM w Świerku. Opłaszczone próbki oraz przeciwciała do jodowania pochodziły z firmy Medgenix.

Podstawowe, fizjologiczne stężenie insuliny w surowicy krwi wynosi 5–15 $\mu\text{U/ml}$.

Insulinooporność oznaczono jako wskaźnik insulinooporności HOMA IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance), obliczony ze wzoru: insulinemia na czczo (mU/ml) x glikemia na czczo (mmol/l)/22,5.

Wartość tego współczynnika w warunkach fizjologicznych wynosi 1,0. [108]

Przyjęto, że wartość HOMA-IR przekraczająca 2,9 wskazuje na insulinooporność. [109]

- Stężenie osteoprotegeryny

W odwirowanej surowicy oznaczono stężenie osteoprotegeryny metodą immunoenzymatyczną ELISA firmy Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG.. Test wykonany był techniką opłaszczonych płytek. Do dołków płytek opłaszczonych przeciwciałem przeciw OPG dodano kolejno 100 μl buforu testowego, 50 μl próbek badanych (lub kontroli lub standardów). Następnie dodano roztwór poliklonalnych przeciwciał przeciw OPG znakowanych biotyną, prowadząc do powstania kompleksu immunologicznego: OPG – przeciwciało przeciwko OPG. Po delikatnym wymieszaniu przeprowadzono 24 godzinną inkubację w temperaturze $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Następnie płytki dokładnie przepłukano buforem celem usunięcia nadmiaru niezwiązanych kompleksów. W kolejnym etapie do dołków dodano 200 μl koniugatu i ponownie inkubowano, tym razem 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie powtórzono procedurę przemywania. Dodano 200 μl roztworu substratu do każdego dołka, po czym po 20 minutach inkubacji w ciemności reakcję zatrzymano roztworem hamującym. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm z filtrem referencyjnym 620 nm, opierając się o fakt, że intensywność barwy jest wprost proporcjonalna do stężenia oznaczanej substancji. Poziom detekcji testu wynosi 0,14 pmol.

- Ocena grubości błony wewnętrznej i środkowej tętnic szyjnych (Intima-Media Thickness – IMT)

Ocena grubości błony wewnętrznej i środkowej tętnic szyjnych wykonywana została metodą nieinwazyjną, ultrasonograficzną, przy użyciu aparatu USG GE Voluson 730 pro, głowicą 12 MHz w Dziale Diagnostyki Obrazowej Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przy ul. Szmarszewskiego 84/82 zawsze przez tego samego lekarza radiologa.

W ocenie ultrasonograficznej w prezentacji 2D w ścianie naczynia udaje się wyodrębnić warstwy o zróżnicowanej echogenności - licząc od strony światła naczynia :

- hiperechogenna
- hipoechogenna
- hiperechogenna.

IMT jest oznaczana jako odległość między pierwszą strukturą hiperechogenną (granica krew - intima), a drugą strukturą hiperechogenną (odbicie wiązki ultradźwięków od przydanki naczynia). Ocena IMT tętnicy szyjnej, ze względu na własności fizyczne wiązki ultradźwiękowej, została dokonana na ścianie dystalnej do głowicy aparatu USG (mniejsza ilość artefaktów, pomiar bardziej wiarygodny). Badanie przeprowadzono w pozycji leżącej pacjenta, z głową odwiedzioną, zwróconą lekko w kierunku przeciwnym do strony badanej. Głowica ustawiona była prostopadle do naczynia. Uwidocznienie tętnicy i ocena IMT odbywała się w kilku projekcjach na przekrojach podłużnych. Pomiary IMT wykonano w kilku punktach na tętnicy szyjnej wspólnej, ok. 1 cm proksymalnie w stosunku do zatoki. Wynik stanowiący grubość kompleksu intima-media przedstawiony został jako średnia trzech wykonanych pomiarów. [110, 111]

4. Krytyka metody

Badana populacja

Na znamienność statystyczną istotny wpływ może mieć mała liczebność badanej grupy. Wynika ona z ograniczeń finansowych, jak również z trudności w doborze pacjentów do badania. Wstępnie planowano bowiem włączać do badania jedynie pacjentów zgłaszających się do Poradni Zaburzeń Metabolicznych lub Kliniki Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego, którzy

nie przyjmowali dotąd leków mogących mieć wpływ na wyniki badania. W literaturze bowiem opisywany jest wpływ leczenia statynami na stężenie OPG, możliwy jest również wpływ terapii hipotensyjnej i hipoglikemizującej na stężenia OPG.

Ostatecznie bowiem do badania, do grupy badanej z ZM, włączono 22 pacjentów stosujących inhibitor konwertazy angiotensyny, 17 pacjentów stosujących antagonistę kanału wapniowego oraz 21 pacjentów stosujących statynę. Ze względu na bezpieczeństwo pacjentów nie odstawiano tych leków. Stosowana farmakoterapia mogła mieć wpływ na wyniki badania.

Możliwość wiarygodnej oceny uzyskanych wyników oparta była na stworzeniu modelu, w którym wielkość dodatkowych czynników wpływających na stężenie OPG w grupie badanej i kontrolnej byłaby na porównywalnym poziomie. Do grupy kontrolnej kwalifikowano pacjentów zdrowych, nie stosujących farmakoterapii, bez otyłości, bez nadciśnienia tętniczego czy cukrzycy.

Ważne było wykluczenie pacjentów z osteoporozą, chorobami zapalnymi i ciężkimi chorobami ogólnoustrojowymi. Jednak wykluczenie tych stanów opierano jedynie na badaniu przedmiotowym, podmiotowym i wynikach badań dodatkowych w ograniczonym zakresie.

Metody badawcze

Za najlepszą metodę, pozwalającą na oznaczenie ilości i rozkładu tkanki tłuszczowej w organizmie, uważa się obecnie obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego. W mojej pracy posłużono się metodą bioimpedancji elektrycznej oraz pomiarem obwodu pasa. Metoda bioimpedancji jest powszechnie uznana i stosowana w badaniach naukowych, zaś obwód pasa jest zalecaną przez klinicystów metodą oceny otyłości brzusznej. Użyto powyższe metody ze względu na ich nieinwazyjność, dostępność i niski koszt badania.

Insulinooporność określono za pomocą HOMA IR. V. Jayagopal i wsp. opisali zmienność wskaźnika HOMA IR nie tylko w grupie badanej, ale także dla tych samych osób badanych kilkakrotnie w niewielkich odstępach czasowych. [112] Pomimo małej precyzji udowodniono jednak, że HOMA IR koreluje z insulinoopornością określoną metodą kłamry metabolicznej. [113] Dla potrzeb niniejszej pracy wskaźnik HOMA IR uznany został jednak za wystarczający.

Zastosowana w moim badaniu i wykorzystywana powszechnie metoda oznaczania stężenia OPG umożliwia oznaczenie stężenia OPG całkowitej: czyli

frakcji wolnej i związanej z RANKL łącznie. Wyższe stężenia OPG w moim badaniu wynikać mogą z podwyższonego stężenia wolnej OPG, jak również wzrostu stężenia kompleksu RANKL-OPG. Nie potrafimy również oznaczyć swoistych tkankowych frakcji OPG. W istotny sposób utrudnia to interpretację wyników, szczególnie, jeśli poszukujemy możliwych mechanizmów działania oznaczanych białek. Ponadto w moim badaniu wykonano oznaczenia stężenia całkowitej OPG, być może w interpretacji wyników pomocne byłoby określenie wzajemnych relacji stężeń całego układu OPG/RANK/RANKL.

Dokonując przeglądu piśmiennictwa opierano się na artykułach opisujących osteoprotegerynę, jak i osteoprotegrynę, opisywana cząsteczka funkcjonuje bowiem pod dwiema nazwami.

5. Metody statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu programu Statistica 6.0 PL for Windows firmy Stat-Soft Inc. Normalność rozkładu zmiennych weryfikowano testem Shapiro-Wilka. Z powodu braku normalnego rozkładu (również po zlogarytmowaniu) wykorzystano testy nieparametryczne. Wartości zmiennych pomiędzy grupami porównano stosując test Manna-Whitneya. Do określenia zależności pomiędzy poszczególnymi zmiennymi zastosowano współczynnik korelacji liniowej Spearmana.

Wszystkie wykazane różnice i wyznaczone współczynniki korelacji przyjęto za statystycznie istotne przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Pomimo braku normalnego rozkładu, dla lepszego zobrazowania, zależności pomiędzy badanymi zmiennymi przedstawiono w aneksie pracy w formie graficznej.

6. Wyniki

Parametry antropometryczne

Badane grupy różniły się między sobą w zakresie parametrów antropometrycznych (BMI, obwód pasa, obwód bioder, WHR, kgFAT, %FAT), co wynika pośrednio z definicji grup.

Tabela 2. Charakterystyka porównawcza badanych grup w zakresie parametrów antropometrycznych.

	grupa badana	grupa kontrolna	p
n	70	20	
BMI (kg/m ²)	35,7 ± 6,4	23,9 ± 1,9	<0,05
obwód pasa (cm)	108,5 ± 12,7	82,4 ± 7,8	<0,05
obwód bioder (cm)	104,9 ± 9,7	86,7 ± 5,0	<0,05
WHR	1,03 ± 0,10	0,95 ± 0,07	<0,05
kgFAT (kg)	35,8 ± 7,9	21,1 ± 5,7	<0,05
%FAT	36,9 ± 7,4	24,2 ± 5,6	<0,05

p – poziom istotności, NS - brak istotności statystycznej, BMI – *Body Mass Index* (wskaźnik masy ciała), WHR – *Waist to Hip Ratio* (wskaźnik talia biodro), kgFAT – bezwzględna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie, %FAT – względna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie

Wartości ciśnienia tętniczego

Badane grupy różniły się między sobą wartościami skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego.

Tabela 3. Charakterystyka porównawcza badanych grup w zakresie średnich wartości ciśnień

	grupa badana	grupa kontrolna	p
n	70	20	
średnie SBP (mmHg)	144,0 ± 12,8	129,9 ± 10,2	<0,05
średnie DBP (mmHg)	89,6 ± 7,8	81,3 ± 6,7	<0,05

p – poziom istotności, NS – brak istotności statystycznej, SBP – *systolic blood pressure* (skurczowe ciśnienie tętnicze), DBP - *diastolic blood pressure* (rozkurczowe ciśnienie tętnicze)

Parametry biochemiczne

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami w zakresie stężenia glukozy, TCH, LDL, HDL, TG, kreatyniny i aktywności AIAT i AspAT.

Tabela 4. Charakterystyka porównawcza badanych grup w zakresie parametrów biochemicznych

	grupa badana	grupa kontrolna	p
n	70	20	
glukoza (mmol/L)	5,9 ± 1,0	5,4 ± 0,4	NS
TCH (mmol/L)	5,6 ± 1,2	5,1 ± 0,6	NS
LDL(mmol/L)	3,5 ± 1,0	3,0 ± 0,8	NS
HDL(mmol/L)	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,6	NS
TG (mmol/L)	2,2 ± 1,3	1,6 ± 0,5	NS
kreatynina (μmol/L)	77,4 ± 14,5	72,9 ± 16,6	NS
AIAT (IU/L)	37,8 ± 18,5	28,0 ± 6,4	NS
AspAT (IU/L)	30,3 ± 17,4	24,7 ± 7,2	NS

p – poziom istotności, NS – brak istotności statystycznej, TCH – cholesterol całkowity, LDL – cholesterol związany z LDL, HDL – cholesterol związany z HDL, TG – triglicerydy, AIAT – aminotransefaza alaninowa, AspAT – aminotransferaza asparaginianowa

Zarówno stężenie insuliny, jak i wskaźnik insulinooporności HOMA w grupie chorych z zespołem metabolicznym były znamienne statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 5. Charakterystyka porównawcza stężeń insuliny i insulinooporności w badanych grupach

	grupa badana	grupa kontrolna	p
n	70	20	
INS (μ UI/ML)	29,2 \pm 10,2	10,4 \pm 3,4	<0,05
HOMA-IR	7,7 \pm 3,1	2,6 \pm 0,9	<0,05

p – poziom istotności, INS – insulina, HOMA-IR – wskaźnik insulinooporności HOMA

Stężenie hsCRP było znamienne statystycznie wyższe w grupie z zespołem metabolicznym w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 6. Charakterystyka porównawcza stężeń CRP w badanych grupach

	grupa badana	grupa kontrolna	p
n	70	20	
hsCRP (mg/L)	4,1 \pm 2,7	2,1 \pm 1,2	<0,05

p - poziom istotności, hsCRP – wysokoczułe białko C-reaktywne

Stężenie OPG było znamienne statystycznie wyższe w grupie z zespołem metabolicznym w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 7. Charakterystyka porównawcza stężenia OPG w badanych grupach

	grupa badana	grupa kontrolna	p
n	70	20	
OPG (pmol/L)	5,7 ± 2,7	2,5 ± 0,5	<0,05

p – poziom istotności, OPG – osteoprotegeryna

Grubość kompleksu IM

Grubość kompleksu IM była znamienne statystycznie większa w grupie z zespołem metabolicznym w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 8. Charakterystyka porównawcza IMT w badanych grupach

	grupa badana	grupa kontrolna	p
n	70	20	
IMT (mm)	1,0 ± 0,3	0,7 ± 0,2	<0,05

p – poziom istotności, IMT – *Intima Media Thickness* (grubość błony wewnętrznej i środkowej)

Wpływ płci na badane parametry

W badanych grupach oceniono wpływ płci na poszczególne parametry. Mężczyzn charakteryzował większy obwód talii i większy WHR w stosunku do kobiet, różnica WHR była istotna statystycznie. Natomiast kobiety wyróżniały się większym obwodem bioder i większą zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie (różnice te były istotne statystycznie).

W grupie mężczyzn w porównaniu do grupy kobiet stwierdzono istotne statystycznie większe stężenie TG i mniejsze stężenie HDL.

Zaobserwowano również większe stężenia kreatyniny i większą aktywność AIAT w grupie mężczyzn w porównaniu do grupy kobiet, różnice te były istotne statystycznie.

Pozostałe parametry biochemiczne i grubość kompleksu IM nie różniły się istotnie pomiędzy grupami.

Tabela 9. Wpływ płci na badane parametry w grupie z ZM

	kobiety	mężczyźni	p
n	34	36	
wiek (lata)	55,0 ± 10,7	50,6 ± 12,2	NS
BMI (kg/m ²)	36,3 ± 5,8	35,1 ± 7,0	NS
obwód pasa (cm)	106,9 ± 12,4	110,0 ± 12,9	NS
obwód bioder (cm)	107,1 ± 9,7	102,9 ± 9,5	<0,05
WHR	0,99 ± 0,10	1,07 ± 0,08	<0,05
kgFAT (kg)	37,8 ± 9,1	33,9 ± 6,1	<0,05
%FAT	39,1 ± 8,1	34,9 ± 6,1	<0,05
średnie SBP (mmHg)	144,4 ± 13,6	143,7 ± 12,2	NS
średnie DBP (mmHg)	89,3 ± 7,7	89,9 ± 7,9	NS
glukoza (mg/dL)	5,9 ± 0,6	6,0 ± 1,3	NS
TCH (mmol/L)	5,8 ± 1,3	5,4 ± 1,1	NS
LDL(mmol/L)	3,7 ± 1,1	3,3 ± 0,8	NS

HDL(mmol/L)	1,4 ± 0,3	1,1 ± 0,2	<0,05
TG (mmol/L)	1,8 ± 1,0	2,5 ± 1,4	<0,05
kreatynina (μmol/L)	71,6 ± 10,8	82,8 ± 15,6	<0,05
AIAT (IU/L)	31,4 ± 14,8	43,8 ± 19,7	<0,05
AspAT (IU/L)	26,1 ± 10,5	34,2 ± 21,4	NS
INS (μUI/ML)	30,6 ± 11,6	27,9 ± 8,5	NS
HOMA-IR	8,0 ± 3,2	7,4 ± 2,9	NS
hsCRP (mg/L)	4,2 ± 2,6	4,1 ± 2,8	NS
OPG (pmol/L)	5,6 ± 2,3	5,8 ± 1,6	NS
IMT (mm)	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,3	NS

p – poziom istotności, NS – brak istotności statystycznej, BMI – *Body Mass Index* (wskaźnik masy ciała), WHR – *Waist to Hip Ratio* (wskaźnik talia biodro), kgFAT – bezwzględna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie, %FAT – względna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie, SBP – *systolic blood pressure* (skurczowe ciśnienie tętnicze), DBP - *diastolic blood pressure* (rozkurczowe ciśnienie tętnicze), TCH – cholesterol całkowity, LDL – cholesterol związany z LDL, HDL – cholesterol związany z HDL, TG – triglicerydy, AIAT – aminotransferaza alaninowa, AspAT – aminotransferaza asparaginianowa, INS – insulina, HOMA-IR – wskaźnik insulinooporności HOMA, hsCRP – wysokoczucie białko C-reaktywne, OPG – osteoprotegeryna, IMT - *Intima Media Thickness* (grubość błony wewnętrznej i środkowej)

Przeprowadzono analizę korelacyjną pomiędzy stężeniem insuliny a pozostałymi ocenianymi parametrami. Korelacje istotne statystycznie przedstawiono w tabeli.

Tabela 10. Istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem insuliny a ocenianymi parametrami

para zmiennych	R Spearman	poziom p
INS & BMI	0,62	<0,05
INS & masa ciała* ¹	0,39	<0,05
INS & obwód pasa	0,52	<0,05
INS & WHR	0,45	<0,05
INS & %FAT	0,61	<0,05
INS & kgFAT	0,51	<0,05
INS & średnie DBP	0,34	<0,05
INS & HOMA-IR	0,89	<0,05
INS & OPG* ²	0,44	<0,05
INS & IMT* ³	0,23	=0,05

p – poziom istotności, NS – brak istotności statystycznej, INS – insulina, BMI – *Body Mass Index* (wskaźnik masy ciała), WHR – *Waist to Hip Ratio* (wskaźnik talia biodro), kgFAT – bezwzględna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie, %FAT – względna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie, DBP - *diastolic blood pressure* (rozkurczowe ciśnienie tętnicze), HOMA-IR – wskaźnik insulinooporności HOMA, OPG – osteoprotegeryna, IMT - *Intima Media Thickness* (grubość błony wewnętrznej i środkowej), * - korelacja zobrazowana na rycinie w aneksie pracy

Przeprowadzono analizę korelacyjną pomiędzy HOMA-IR a pozostałymi ocenianymi parametrami. Korelacje istotne statystycznie przedstawiono w tabeli.

Tabela 11. Istotne statystycznie korelacje pomiędzy HOMA-IR a ocenianymi parametrami

para zmiennych	R Spearman	poziom p
HOMA-IR & BMI	0,56	<0,05
HOMA-IR & masa ciała	0,43	<0,05
HOMA-IR & obwód pasa	0,42	<0,05
HOMA-IR & WHR	0,39	<0,05
HOMA-IR & %FAT	0,54	<0,05
HOMA-IR & kgFAT	0,45	<0,05
HOMA-IR & średnie DBP* ⁴	0,28	<0,05
HOMA-IR & glukoza	0,43	<0,05
HOMA-IR & INS	0,89	<0,05
HOMA-IR & OPG* ⁵	0,54	<0,05

p – poziom istotności, NS – brak istotności statystycznej, BMI – *Body Mass Index* (wskaźnik masy ciała), WHR – *Waist to Hip Ratio* (wskaźnik talia biodro), kgFAT – bezwzględna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie, %FAT – względna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie, DBP - *diastolic blood pressure* (rozkurczowe ciśnienie tętnicze), INS – insulina, HOMA-IR – wskaźnik insulinooporności HOMA, OPG – osteoprotegeryna, * - korelacja zobrazowana na rycinie w aneksie pracy

Przeprowadzono analizę korelacyjną pomiędzy stężeniem hsCRP a pozostałymi ocenianymi parametrami. Korelacje istotne statystycznie przedstawiono w tabeli.

Tabela 12. Istotne statystycznie korelacje pomiędzy hsCRP a ocenianymi parametrami

para zmiennych	R Spearman	poziom p
hsCRP & BMI	0,35	<0,05
hsCRP & masa ciała	0,29	<0,05
hsCRP & obwód bioder	0,22	<0,05
hsCRP & obwód pasa	0,33	<0,05
hsCRP & %FAT* ⁶	0,26	<0,05
hsCRP & kgFAT	0,42	<0,05
hsCRP & średnie DBP	0,26	<0,05
hsCRP & AspAT	0,27	<0,05
hsCRP & OPG* ¹⁰	0,35	<0,05

p – poziom istotności, NS – brak istotności statystycznej, BMI – *Body Mass Index* (wskaźnik masy ciała), kgFAT – bezwzględna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie, %FAT – względna zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie, DBP - *diastolic blood pressure* (rozkurczowe ciśnienie tętnicze), AspAT – aminotransferaza asparaginianowa, hsCRP – wysokoczułe białko C-reaktywne, OPG – osteoprotegeryna, * - korelacja zobrazowana na rycinie w aneksie pracy

Przeprowadzono analizę korelacyjną pomiędzy stężeniem OPG a pozostałymi ocenianymi parametrami. Korelacje istotne statystycznie przedstawiono w tabeli.

Tabela 13. Istotne statystycznie korelacje pomiędzy OPG a ocenianymi parametrami

para zmiennych	R Spearman	poziom p
OPG & masa ciała* ⁷	0,29	<0,05
OPG & WHR* ⁸	0,46	<0,05
OPG & średnie DBP* ⁹	0,25	<0,05
OPG & hsCRP* ¹⁰	0,35	<0,05
OPG & INS* ²	0,44	<0,05
OPG & HOMA-IR* ⁵	0,54	<0,05

p – poziom istotności, WHR – *Waist to Hip Ratio* (wskaźnik talia biodro), DBP - *diastolic blood pressure* (rozkurczowe ciśnienie tętnicze), INS – insulina, HOMA-IR – wskaźnik insulinooporności HOMA, hsCRP – wysokoczułe białko C-reaktywne, OPG – osteoprotegeryna, * - korelacja zobrazowana na rycinie w aneksie pracy

Przeprowadzono analizę korelacyjną pomiędzy IMT a pozostałymi ocenianymi parametrami. Korelacje istotne statystycznie przedstawiono w tabeli.

Tabela 14. Istotne statystycznie korelacje pomiędzy IMT a ocenianymi parametrami

para zmiennych	R Spearman	poziom p
IMT & masa ciała* ¹¹	0,29	<0,05
IMT & obwód pasa* ¹²	0,36	<0,05
IMT & INS* ³	0,23	=0,05

p – poziom istotności, INS – insulina, IMT – *Intima Media Thickness* (grubość błony wewnętrznej i środkowej), * - korelacja zobrazowana na rycinie w aneksie pracy

7. Omówienie

7.1. OPG a ZM

Przeprowadzono wiele badań, w których brali udział chorzy z licznymi czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej, jednak częściej analizy statystyczne oceniały wpływ poszczególnych czynników ryzyka na stężenie OPG. Rzadko autorzy oceniali chorych pod kątem obecności rozpoznania ZM. Dlatego dostępnych jest niewiele badań oceniających stężenie OPG u pacjentów z ZM.

Dane dotyczące stężenia OPG w ZM są rozbieżne. I tak, Gannagé-Yared i wsp. badali 151 mężczyzn w wieku 50 – 83 lat, bez cukrzycy. Zauważyli oni trend (bez istotności statystycznej) do wyższych stężeń OPG u osób bez ZM, w porównaniu do osób z rozpoznaniem ZM. [114] Z kolei Golledge i wsp. badali pacjentów z chromaniem przestankowym, w tej grupie stężenia OPG były podwyższone u pacjentów z ZM. [115] Natomiast Nabipor i wsp. oceniali stężenia OPG u 382 kobiet po menopauzie. Ich badanie nie wykazało żadnych istotnych różnic pomiędzy średnimi stężeniami OPG w grupie kobiet z ZM i grupie bez ZM. Również po uwzględnieniu wpływu wieku obecność ZM nie wykazała żadnego związku ze stężeniem OPG. W badanej grupie średnie stężenia OPG nie zależały również od obecności nadciśnienia tętniczego, dylipidemii, nietolerancji glukozy czy otyłości brzusznej. [116]

U pacjentów z ZM w moim badaniu obserwowano istotnie wyższe stężenia osteoprotegeryny w porównaniu z grupą kontrolną.

7.2. Czynniki wpływające na stężenie OPG.

OPG a wiek

Poszukując zależności rozwoju miażdżycy od stężenia OPG na etapie subklinicznym, należy wziąć pod uwagę wiele czynników, które mogą wpływać na zwiększenie jej stężenia, lub też wynikać z jej działania. Próby określenia zakresu wartości

referencyjnych tego białka pozwoliły zauważyć zmienność stężenia OPG zależną od wieku. Co do tego parametru istnieje zgodność w prowadzonych w ostatnich latach badaniach. Kudlacek i wsp. oceniali stężenie OPG u 1134 zdrowych ludzi w wieku 19 – 96 lat, nie kwalifikowali do badania osób z wywiadem chorób, które mogłyby wpłynąć na badane parametry. Zgodnie z ich wynikami u zdrowych kobiet i mężczyzn stężenia OPG rosną wraz z wiekiem. Gwałtowniejszy wzrost obserwowany jest u kobiet około 60 roku życia, u mężczyzn około 70 roku życia. Zmienność wartości OPG jest mniejsza u osób poniżej 50 roku życia. [117] Obserwacje potwierdzone zostały również w badaniu the Framingham Study (3250 uczestników, populacja zróżnicowana pod względem czynników ryzyka i obecności choroby sercowo-naczyniowej), gdzie wykazano dodatnią korelację stężenia OPG z wiekiem. [101] U 286 zdrowych kobiet w wieku 37 do 73 lat wzrost stężenia OPG z wiekiem opisali Oh i wsp. [118] Obserwacje te potwierdza również badanie Gannagé-Yared i wsp. u mężczyzn w wieku 50 – 83 lat. [119]

W mojej pracy nie stwierdzono korelacji stężenia OPG z wiekiem badanych osób, co może wynikać z faktu iż średnia wieku analizowanej populacji wynosiła 52 vs 48 lat. Powyższa obserwacja potwierdza zatem cytowane badanie Kudlacka, wskazujące iż około 50 roku życia zmienność stężenia OPG jest niewielka.

OPG a otyłość

Niemalym zaskoczeniem dla badaczy jest potwierdzany w wielu badaniach brak korelacji bądź ujemna korelacja stężenia OPG i wskaźników otyłości brzusznej (BMI, obwód pasa). Stężenie OPG u osób otyłych wykazuje tendencję do spadku, zaś zależność ta jako istotna statystycznie została wykazana w wielu badaniach. Wyniki te pozwoliły na wysunięcie hipotezy, że OPG nie bierze udziału w szlakach metabolicznych i procesach przyczyniających się do rozwoju miażdżycy, lecz może być elementem układu o działaniu przeciwmiażdżycowym. Jej zwiększone stężenia u osób z miażdżycą miałyby wtedy obrazować uruchomiony mechanizm ochronny.

Gannagé-Yared i wsp. badając grupę 106 otyłych uczestników i 64 o prawidłowej masie ciała, stwierdzili brak istotnych różnic w stężeniu OPG pomiędzy obiema analizowanymi populacjami, a także nie wykazali istotnej zależności pomiędzy OPG

a BMI, ani pomiędzy OPG i obwodem pasa. W czasie obserwacji 6 miesięcznej po leczeniu chirurgicznym otyłych chorych uzyskano średnio 23,5% redukcję masy ciała. Jednak uzyskany spadek masy ciała nie wpłynął na stężenie OPG. [114]

Odmienne wyniki zaprezentował Hołcki i wsp., badacze ci wykazali, że stężenia OPG u 43 otyłych kobiet w okołomenopauzalnym wieku, bez innych schorzeń towarzyszących, było niższe niż w grupie kontrolnej. Zaś redukcja masy ciała indukowała istotny dalszy spadek stężenia OPG. [120] Ugur-Altun i wsp. oceniając stężenie OPG u otyłych młodych dorosłych, również dowiedli iż stężenie OPG jest znamienne niższe u chorych otyłych w porównaniu z grupą kontrolną. [121]

Nabipour i wsp. nie znaleźli jednak istotnej zależności pomiędzy otyłością a stężeniem OPG u 382 kobiet po menopauzie. [116] Nie potwierdzili zatem spostrzeżeń Hołckiego i wsp. oraz Ugur-Altun i wsp..

W ten ciąg rozbieżnych informacji wpisują się wyniki własne. Uzyskane dane wskazują na istotną zależność pomiędzy stężeniem OPG a masą ciała, stężenia OPG były istotnie wyższe u osób otyłych z zespołem metabolicznym. Badania własne potwierdzają spostrzeżenia Golledge i wsp. dowodzące, iż otyłości towarzyszy wzrost stężenia OPG u pacjentów z miażdżycą tętnic kończyn dolnych. [115]

Te rozbieżne dane mogą wynikać z faktu iż w cytowanym piśmiennictwie oceniano zróżnicowane populacje, badano np. chorych z miażdżycą tętnic kończyn dolnych, chorych po operacjach bariatrycznych i w różnym wieku.

OPG a ciśnienie tętnicze, stężenie cholesterolu

W doniesieniach z literatury możemy znaleźć także wiele korelacji OPG z klasycznymi czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej: hipercholesterolemią czy nadciśnieniem tętniczym. W przytoczonym wcześniej badaniu Gannagé-Yared i wsp. na otyłych, nie stwierdzono zależności OPG od wartości ciśnienia skurczowego, ciśnienia rozkurczowego, stężenia cholesterolu całkowitego, stężenia cholesterolu HDL czy stężenia triglicerydów. [114] Oh i wsp. badając kobiety w wieku 37 – 73 lat również nie stwierdzili zależności pomiędzy nadciśnieniem tętniczym, stężeniem triglicerydów czy stężeniem cholesterolu HDL a stężeniem OPG. Natomiast stężenie

OPG u osób z wyższymi stężeniami cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL, było nieznacznie wyższe, bez istotności statystycznej. [118] Odmienne wyniki uzyskali Uemura wsp. u 80 kobiet po menopauzie. Wykazali oni dodatnią korelację stężenia OPG z wartościami ciśnienia skurczowego i rozkurczowego, natomiast brak korelacji z wartościami profilu lipidowego. Podobnie w moim badaniu uzyskano dodatnią korelację stężenia OPG z wartościami rozkurczowego ciśnienia tętniczego.

OPG a HOMA IR

Poszukiwania możliwych mechanizmów, poprzez które OPG wpływa na układ sercowo-naczyniowy, lub które wpływają na stężenie OPG, skupiły się również na zjawisku insulinooporności.

W badaniu Gannagé-Yared i wsp. wykazali, że u otyłych pacjentów stężenie OPG koreluje ze wskaźnikiem insulinooporności HOMA IR, niezależnie od wieku badanego. HOMA IR był niezależnym wskaźnikiem stężenia OPG. [114] Także w badaniu Kim i wsp. stężenie OPG wykazało istotną korelację ze wskaźnikiem HOMA IR u pacjentów z cukrzycą nowo rozpoznaną. [122] Również u pacjentów z cukrzycą typu 2 wykazano istotną statystycznie korelację stężenia OPG ze stężeniem insuliny i insulinoopornością. [123]

Natomiast badanie Oh i wsp. na grupie 286 zdrowych kobiet bez cech otyłości nie potwierdziło istotnej korelacji pomiędzy OPG a HOMA IR. [118] Również O'Sullivan i wsp. w grupie 115 mężczyzn wykazali brak korelacji HOMA IR ze stężeniem OPG. Stężenie OPG było natomiast wyższe u mężczyzn z upośledzoną tolerancją glukozy. [124]

W moim badaniu uzyskano korelację stężenia OPG ze stężeniem insuliny oraz wskaźnikiem HOMA-IR u chorych z ZM, zatem przytoczone dane potwierdzają obserwacje z prac Gannagé-Yared i wsp. oraz Kim i wsp..

OPG a stan zapalny

CRP - jeden z głównych markerów stanu zapalnego, dobrze korelujący z ryzykiem sercowo-naczyniowym wykazuje również dodatnią korelację ze stężeniem OPG. Rhee i wsp. badali 100 pacjentów z chorobą wieńcową; zarówno stężenie CRP, jak i OPG rosło wraz z liczbą zajętych miażdżycowo naczyń wieńcowych. Ponadto stężenie CRP wykazało dodatnią korelację ze stężeniem OPG, nawet po uwzględnieniu wpływu wieku. [93] Kim i wsp. badali stężenia OPG i markerów stanu zapalnego u pacjentów z nowo rozpoznana cukrzycą. Wykazali dodatnią korelację OPG z CRP oraz IL 6, niezależnie od płci i wieku badanych pacjentów. [122] Yaturu i wsp. potwierdzili w swoim badaniu na 50 chorych z cukrzycą typu 2 dodatnią korelację pomiędzy stężeniem OPG a CRP, ponadto stężenie OPG korelowało również z TNF α , będącym cytokiną prozapalną. [123] Korelację stężenia OPG ze stężeniem CRP wykazali ponadto Gannagé-Yared i wsp. u otyłych chorych. W tym badaniu CRP było niezależnym predyktorem zwiększonego stężenia OPG. [114]

Uzyskane wyniki z mojego badania potwierdzają również dodatnią korelację stężenia OPG z CRP, a zatem OPG uczestniczy w procesie zapalenia o niewielkim nasileniu u osób z ZM.

Dodatnia korelacja stężenia OPG z markerami stanu zapalnego: CRP, IL 6, TNF α wykazana została wielokrotnie, ponadto również badania *in vitro* potwierdzają ich związek patogenetyczny. Wykazano bowiem, że cytokiny prozapalne, takie jak TNF α i IL 6 indukują ekspresję OPG w komórkach mięśni gładkich i komórkach śródbłonna, w odpowiedzi OPG reguluje odpowiedź zapalną. [125]

Odkąd czynniki prozapalne uważane są za kluczowe w rozwoju miażdżycy, wyniki te mogą sugerować udział OPG w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego.

7.3. IMT a ZM

Stopień ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego lub subklinicznych uszkodzeń narządowych u osób z ZM dobrze odzwierciedla pomiar IMT. Jak przedstawiono bowiem wcześniej IMT jest dobrym markerem miażdżycy na etapie subklinicznym.

Zależność IMT od ZM badana była przez wielu badaczy. W badaniu ISMIR (Ispessimento Medio Intimale e Rischio cardiovascolare) uczestniczyło 470 osób, u 80 rozpoznano ZM. U chorych z ZM większe było rozpowszechnienie blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych i częściej stwierdzano $IMT > 0,80$ mm. [126]

W badaniu the Guangzhou Biobank Cohort Study – CVD uczestniczyło 596 mężczyzn i 526 kobiet, u 14% spośród nich rozpoznano ZM. Wraz ze zwiększoną liczbą składowych rozpoznanego ZM znacząco wzrastała IMT. Dodatkowo w badaniu tym wykazano, że korelacja ta była niezależna od insulinooporności. [127] Ahn i wsp. na grupie 702 dorosłych biorących udział w the ARIRANG study (Atherosclerosis Risk of a Rural Area koreaN General population) wykazali, że wśród osób z ZM stanowiących 38,6 % badanych średnia IMT była znacząco większa. [128] Matoba i wsp. wykazali nie tylko zwiększoną IMT, lecz również zwiększoną progresję IMT, Tym większą im większa była liczba elementów tworzących ZM. [129] Adolphe i wsp. badali zależność IMT od czynników składających się na ZM u 2268 ochotników w wieku 14 – 79 lat. Wykazali, wzrost IMT od 0,516 mm u osób bez ZM, przez 0,576 mm u osób z 1 składową ZM, 0,593 u osób z 2 składowymi ZM, 0,660 mm u osób z 3 do 0,688 mm z 4 lub więcej składowymi ZM. Również u młodych dorosłych była obserwowana podobna zależność. [130] W badaniu RIVANA (the Risk of Vascular Disease in Navarra Study) brało udział 550 uczestników z ZM i 550 bez cech ZM, bez objawów powikłań sercowo-naczyniowych, w wieku 45-74 lat. Wykazano zależność IMT od obecności ZM zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. Spośród składowych ZM również otyłość brzuszna i nieprawidłowa glikemia na czczo były związane ze zwiększeniem IMT. [131]

Wyniki przytoczonych powyżej badań potwierdzone zostały w mojej pracy. Wśród pacjentów z ZM stwierdzono większą wartość IMT w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$).

Nieliczne prace wskazują na związek ZM z IMT tylko u kobiet. Chen i wsp. badali 354 kobiety i 456 mężczyzn powyżej 39 roku życia. Analiza wykazała dodatnią korelację grubości IMT z obecnością ZM tylko u kobiet. Być może na rozkład ten wpłynęły inne czynniki, bowiem większa była częstość ZM u kobiet w badanej grupie w porównaniu do mężczyzn (odpowiednio 58,8 i 34,2%). [132]

W mojej pracy pogrubienie kompleksu IM było znamienne statystycznie zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn.

Insulinooporność a miażdżyca na etapie subklinicznym

Poszukując przyczyn zwiększonej grubości kompleksu IM Pannacciulli i wsp. badali 401 uczestników w wieku 18 – 45 lat, którzy mieli prawidłową tolerancję glukozy. W tej grupie wystąpiła dodatnia korelacja IMT między innymi ze wskaźnikiem HOMA IR oraz stężeniem glukozy na czczo. Aczkolwiek analiza wieloczynnikowa wykazała, że HOMA IR nie jest niezależnym czynnikiem wpływającym na IMT. W przypadku prawidłowej insulinooporności na grubość IM mają wpływ prawdopodobnie inne czynniki. [133] Bertoni i wsp. w badaniu the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis poszukiwali zależności subklinicznej miażdżycy od stopnia insulinooporności u osób z ZM. W badaniu tym uczestniczyło 5810 osób w wieku 45 – 84 lat bez cukrzycy. Stopień insulinooporności oceniano na podstawie HOMA IR, natomiast miażdżycę na etapie subklinicznym na podstawie pomiaru IMT. Wspomniani autorzy stwierdzili dodatnią korelację pomiędzy HOMA IR a zwiększonym IMT również po uwzględnieniu wieku, poziomu cholesterolu LDL czy palenia papierosów. Natomiast uwzględnienie pozostałych składowych zespołu metabolicznego wykazało brak zależności HOMA IR od zwiększonego IMT. Autorzy przypuszczają, że wpływ insulinooporności na miażdżycę może zachodzić pośrednio poprzez podwyższone ciśnienie tętnicze czy dyslipidemię. [134] Fakt, że insulinooporność obrazowana za pomocą wskaźnika HOMA IR nie jest niezależnym wskaźnikiem choroby sercowo-naczyniowej wykazano w badaniu the Framingham Offspring Study. Badano 2898

pacjentów, bez cukrzycy i choroby sercowo-naczyniowej, wykazano korelację obecności ZM, insulinooporności (określonej za pomocą wskaźnika HOMA IR oraz ISI – Insulin Sensitivity Index) z rozwojem choroby sercowo-naczyniowej po 7 latach. Natomiast po uwzględnieniu wieku, płci, cholesterolu LDL, palenia papierosów i obecności ZM wykazano niezależną dodatnią korelację ISI z rozwojem choroby sercowo-naczyniowej. Nie spostrzegano tej korelacji dla wskaźnika HOMA IR. [135] Natomiast Koskinen i wsp. w badaniu 1809 uczestników w wieku 27 – 37 lat wykazali, że podwyższony poziom insuliny u młodych dorosłych predysponował do szybszej progresji grubości IM. [136]

W mojej pracy grubość kompleksu IM nie korelowała ze wskaźnikiem HOMA IR. Możliwe jest, że insulinooporność wpływa na pogrubienie kompleksu IM i dalej rozwój miażdżycy poprzez generowane nadciśnienie tętnicze czy dyslipidemię. Możliwe również, że wskaźnik HOMA nie odzwierciedla dostatecznie procesów zachodzących na poziomie komórkowym.

Insulinooporność od dawna została uznana za najistotniejszy element ZM i istotny czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Jest kluczowym mechanizmem patogenetycznym ZM. Liczne badania epidemiologiczne wskazują na silny związek insulinooporności z chorobami układu sercowo-naczyniowego. [137] W badaniu Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) wykazano związek pomiędzy insulinoopornością a miażdżycą. [138] Insulina niezależnie od jej wpływu na metabolizm węglowodanów, gospodarkę lipidową czy ciśnienie tętnicze ma właściwości aterogenne. Hormon ten zwiększa proliferację komórek mięśni gładkich w naczyniach krwionośnych, sprzyja przechodzeniu do nich cholesterolu oraz stymuluje endogenną syntezę lipidów w tych komórkach. Ponadto wykazano, iż insulina zwiększa syntezę kolagenu w ścianie naczyń, stymuluje produkcję licznych czynników wzrostu. Dodatkowym niekorzystnym elementem towarzyszącym insulinooporności jest zwiększona krzepliwość krwi i upośledzona fibrynoliza. Wykazano silną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem insuliny na czczo a poziomami PAI-1, VII czynnika krzepnięcia, czynnika von Willebranda i fibrynogenu zarówno u mężczyzn jak i kobiet. [139]

W świetle powyższych danych oczywistym stało się, że insulinooporność to nie tylko problem zmniejszonego wnikania glukozy do komórek w odpowiedzi na bodziec insulinowy, lecz także szereg niekorzystnych następstw znamienne zwiększających ryzyko chorób układu sercowo-naczyniowego.

Analiza wskaźnika HOMA IR u pacjentów w niniejszym badaniu wykazała korelację zmniejszonej insulinooporności z ZM. Potwierdza to kolejny raz, że konstelacja czynników tworzących ZM związana jest z insulinoopornością.

Stan zapalny a miażdżycy na etapie subklinicznym

Jednym z kluczowych elementów patogenezy ZM jest stan zapalny o niewielkim nasileniu, w istotny sposób przyczynia się on do zwiększenia ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Dobrze poznanym markerem stanu zapalnego, który koreluje z ryzykiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych jest CRP. Hipoteza ta została potwierdzona w licznych badaniach: Physicians' Health Study (PHS), Women's Health Study (WHS), Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC), Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS) in the United States, Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease (MONICA) oraz Reykjavik Studies. [140, 141, 142, 143, 144, 145]

W licznych badaniach wykazano również, że stężenia CRP są zwiększone u osób z ZM. [146] Yudkin i wsp. wykazali, że stężenia CRP korelują z insulinoopornością (obrazowaną za pomocą HOMA IR), ciśnieniem tętniczym, niskim stężeniem cholesterolu HDL, stężeniem triglicerydów oraz cytokin prozapalnych: interleukiny 6 (IL-6) i TNF α . BMI oraz HOMA IR najlepiej determinowały nasilenie stanu zapalnego. Wykazali także zależność pomiędzy liczbą składowych ZM a wzrastającym stężeniem CRP. [147]

Festa i wsp. w badaniu Insulin Resistance and Atherosclerosis Study (IRAS) wykazali dodatnią korelację CRP z BMI, obwodem pasa, ciśnieniem tętniczym, stężeniem triglicerydów, cholesterolu LDL oraz insulinoopornością. [148]

W badaniu the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS), w którym brało udział 6447 mężczyzn, wykazano zwiększone ryzyko sercowo-naczyniowe u pacjentów z ZM, którzy mieli stężenia CRP > 3 mg/l. [149]

CRP wywiera proaterogenny efekt poprzez komórki naczyń krwionośnych, co obrazowane jest zwiększonym wydzielaniem MCP – 1 (monocyte chemoattractant protein 1) przez komórki śródbłonna, redukcją stężenia tlenku azotu (NO), indukcją molekuł adhezyjnych: VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule -1 - naczyniowa cząsteczka adhezji komórek - 1), ICAM – 1 (intercellular adhesion molecule -1 – wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezji -1) i E-selectin (E-selektyna). MCP-1 jest chemokiną prowadzącą do infiltracji ściany naczynia przez monocyty. Natomiast wzrost ekspresji receptorów adhezyjnych prowadzi do zwolnienia przepływu leukocytów w naczyniach włosowatych, zwiększania ich przylegania do komórek śródbłonna i ich przechodzenia do tkanek. Redukcja stężenia NO prowadzi natomiast do zahamowania wazo-relaksacji małych naczyń. [150, 151, 152] Zwiększona ekspresja molekuł adhezyjnych w ścianie naczynia jest istotnym czynnikiem, który nasila miejscową odpowiedź zapalną i infiltrację przez monocyty i limfocyty również w obrębie nie zmienionego miażdżycowo naczynia, jak i w obrębie blaszki miażdżycowej.

Markery stanu zapalnego, szczególnie CRP korelują z rozwojem objawowej miażdżycy, a także zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym.

W badaniu the Framingham Heart Study, zbadano 2885 uczestników, średni wiek 59 lat, 53% kobiet wykazano dodatnią korelację IMT (tętnicy szyjnej wewnętrznej) z CRP. Badając wspólnie zależność różnych markerów stanu zapalnego (CRP, IL 6, MCP 1, P-selectin, CD40 ligand, ICAM - 1) wykazano że markery stanu zapalnego oznaczone w tym badaniu korelowały z IMT tętnicy szyjnej wewnętrznej, lecz nie IMT tętnicy szyjnej wspólnej. [153]

Danych na temat związku miażdżycy na etapie subklinicznym ze stężeniem CRP Yu i wsp. poszukiwali u kobiet w wieku pomenopauzalnym. W populacji kobiet ze stężeniami CRP pomiędzy 0,5 a 1,0 mg/l spostrzegali większe wartości IMT niż u kobiet z CRP mniejszym niż 0,5 mg/l. [154]

W badaniu własnym nie wykazano korelacji pomiędzy IMT a stężeniem CRP, co może wiązać się z faktem, iż przedmiotem analizy w cytowanym badaniu były kobiety

z niskim stężeniem CRP, natomiast w mojej populacji średnie stężenia CRP wynosiły 4,1 mg/L.

IMT koreluje raczej z klasycznymi czynnikami ryzyka, związek z CRP jest niejednoznaczny na wczesnym etapie uszkodzeń narządowych. Prawdopodobnie wynika ze współistnienia innych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego.

7.4. OPG a IMT. OPG – nowy marker miażdżycy?

Interesujące są poszukiwania nowych markerów miażdżycy i ich wzajemnych korelacji. Badania ostatnich lat poświęcają dużo miejsca OPG, której możliwy udział w procesie aterogenezy jest szeroko dyskutowany. Doniesienia o kalcyfikacji błony środkowej aorty i tętnic nerkowych u myszy pozbawionych genu OPG zapoczątkowały poszukiwania możliwego wpływu OPG na proces aterogenezy u ludzi. Brändström i wsp. wykazali wpływ polimorfizmu genu OPG u ludzi na morfologię i funkcję naczyń krwionośnych. W badaniu 59 zdrowych uczestników wykazali korelację polimorfizmu genu OPG z grubością kompleksu IM. [155] W kolejnym badaniu oceniali wpływ polimorfizmu genu OPG na IMT u 100 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i przerostem lewej komory. Potwierdzili wpływ OPG na IMT u osób z nadciśnieniem, co interesujące jednak, w grupie kontrolnej 75 zdrowych osób nie uzyskali korelacji. [89]

Kiechl i wsp. w badaniu the Bruneck Study na grupie 125 kobiet i 125 mężczyzn w wieku 50 – 80 lat, wykonali ultrasonograficzne badanie tętnic szyjnych oraz oznaczenie stężenia OPG wyjściowo i po 10 latach obserwacji. Poziom OPG wykazał dodatnią korelację z obecnością miażdżycy w tętnicach szyjnych, po uwzględnieniu wpływu wieku i płci korelacja ta uległa zmniejszeniu, ale pozostała istotna statystycznie. OPG okazała się także predyktorem postępu zmian miażdżycowych w tętnicach szyjnych, wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego i zgonu z powodu chorób serca. Natomiast analiza związku stężenia OPG z grubością kompleksu IM (po uwzględnieniu wieku i płci) nie wykazała statystycznie istotnej korelacji. [156]

Jednak Akinci i wsp. prowadząc badania nad korelacją OPG z IMT u 46 kobiet z wywiadem cukrzycy ciężowej, wykazali, że poziom OPG był predyktorem grubości kompleksu IM u tych kobiet. [157] Podobnie Siepi i wsp. prowadząc badania na grupie 195 kobiet po menopauzie, w wieku 43 – 75 lat, potwierdzili, że OPG jest predyktorem IMT. [158]

U 47 pacjentów w schyłkowej fazie niewydolności nerek OPG okazała się dobrym predyktorem nie tylko IMT, ale również progresji i dalszego wzrostu IMT, jak również zgonu. [159]

Przedstawione badania dostarczają sprzecznych danych na temat korelacji OPG i IMT, wpływ na obydwie parametry mają bowiem liczne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego. Cennych danych dostarczyło badanie the Tromsø Study, które objęło 6516 uczestników w wieku 25 – 85 lat. Analiza otrzymanych wyników wykazała wzrost IMT wraz ze wzrostem stężenia OPG, niezależnie od „tradycyjnych” czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (wiek, płeć, cholesterol całkowity, cholesterol HDL, CRP, BMI, skurczowe ciśnienie tętnicze, obecność choroby sercowo-naczyniowej czy cukrzycy). Ponadto analiza wykazała silniejszą korelację OPG z IMT dla osób, które ukończyły 55 rok życia. [160]

Wyniki mojej pracy nie wykazały korelacji pomiędzy grubością kompleksu IM a stężeniem OPG w grupie pacjentów z ZM. Jakkolwiek zarówno wartości OPG jak i IMT były istotnie wyższe u chorych z ZM, co potwierdza obserwacje Kiechla i wsp. w badaniu the Bruneck Study.

Przypuszczamy, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy subkliniczną miażdżycą a stężeniem OPG. Natomiast zmienność tej korelacji wynikać może z różnorodności dobieranych grup oraz dużej liczby czynników, które mają wpływ na obydwie korelowane parametry.

7.5. OPG a IMT – czy OPG bierze udział w początkowym etapie rozwoju miażdżycy?

Wciąż poszukiwana jest odpowiedź na pytanie czy OPG jest odpowiedzią na proces aterogenezy czy bierze czynny udział w tworzeniu blaszki miażdżycowej.

Odpowiedź na to pytanie będzie milowym krokiem naprzód w poszukiwaniu nowych możliwości terapeutycznych u pacjentów z dużym ryzykiem miażdżycy.

Badania na modelach zwierzęcych

Próba odpowiedzi na pytanie o mechanizm działania OPG zapoczątkowała badania na zwierzęcych modelach. Szczególnie wrażliwe na rozwój miażdżycy są myszy pozbawione genów dla receptora LDL ($LDLR^{-/-}$) lub apolipoproteiny E ($apoE^{-/-}$), ważnej w metabolizmie cholesterolu. Tak zmodyfikowane genetycznie myszy mają bardzo duże stężenie cholesterolu w krwi, miażdżycy rozwija się u nich bardzo szybko, a proces ten przyspiesza dieta bogata w tłuszcze. Myszy te krzyżuje się z innymi myszami pozbawionymi genów kodujących substancje, którym przypisuje się rolę w rozwoju miażdżycy. Współcześnie za najbardziej przekonujący, eksperymentalny dowód istotnego wpływu badanej substancji na miażdżycę u ludzi uważa się zmianę nasilenia rozwoju miażdżycy w tak utworzonym modelu zwierzęcym.

Badanie opisane przez Bennetta i wsp. na myszach pozbawionych genu dla apoE i OPG ($apoE^{-/-}.OPG^{-/-}$) potwierdziło hipotezę, że brak OPG prowadzi do nasilenia zmian miażdżycowych, jak również szybszej kalcyfikacji błony wewnętrznej i środkowej tętnic. Jakkolwiek zauważyć należy, że nasilenie to obserwowane było w 40 i 60 tygodniu życia myszy, w 20 tygodniu nasilenie zmian w tętnicach było porównywalne pomiędzy myszami badanymi i grupą kontrolną. Co interesujące nie wykazano istotnej różnicy pomiędzy stężeniami cholesterolu całkowitego i cholesterolu HDL pomiędzy myszami $apoE^{-/-}.OPG^{-/-}$ a myszami z grupy kontrolnej $apoE^{-/-}.OPG^{+/+}$. Autorzy sugerują ochronną rolę OPG w procesie miażdżycy i kalcyfikacji tętnic. Oddziaływanie na proces aterogenezy zachodzi wg autorów pracy prawdopodobnie poprzez regulacje odpowiedzi zapalnej i wpływ na przeżycie komórek. Natomiast nasilona kalcyfikacja naczyń u myszy pozbawionych genu OPG jest prawdopodobnie skutkiem ciężkiej osteoporozy i nasilenia aktywności fosfatazy alkalicznej u tych zwierząt. [80]

Morony i wsp. stworzyli model myszy pozbawionych genu LDLR, karmionych dietą wysokotłuszczową, podawali zwierzętom rekombinowaną OPG lub placebo. U

zwierząt pozbawionych leczenia obserwowano rozwój miażdżycy z kalcyfikacją blaszek miażdżycowych, oraz wzrost stężenia endogennej OPG. Wzrost stężenia OPG następował już po 2 tygodniach stosowania diety aterogennej, następnie utrzymywał się na tym samym poziomie do 4 miesięcy obserwacji. Ekspresja mRNA dla OPG w ścianie naczyń krwionośnych pozostawała na tym samym poziomie. U zwierząt leczonych OPG obserwowano taki sam postęp rozwoju zmian miażdżycowych, zredukowana została jedynie ich kalcyfikacja. Również tkankowe poziomy TNF α i IL1 β pozostały na wyjściowym poziomie. Badacze sugerują aktywny udział OPG jedynie w procesie kalcyfikacji tętnic. Sugerują rolę OPG raczej jako markera, nie mediatora aterogenezy. [82]

Musimy jednak postawić sobie pytanie, na ile wyniki uzyskane z badań na modelach zwierzęcych mogą być przydatne do zrozumienia procesów zachodzących u ludzi. Mogą bowiem istnieć różnice gatunkowe. Należy sobie zdawać również sprawę, że skoncentrowanie się jedynie na izolowanym fragmencie złożonego systemu regulacyjnego może prowadzić do błędnych wniosków. Być może nie sama OPG ma kluczowe znaczenie dla rozwoju miażdżycy, ale istotne byłoby przeprowadzenie badań uwzględniających cały system sygnałowy OPG/RANK/RANKL.

Miażdżycyca jako proces zapalny

Miażdżycyca to przewlekła choroba zapalna tętnic, cechująca się tworzeniem charakterystycznych zmian w ścianie naczynia, z naciekami zapalnymi, gromadzeniem lipidów i włóknieniem. Współczesna definicja na pierwszym miejscu stawia rolę zapalenia, w miejsce starej koncepcji biernej akumulacji lipidów w ścianie naczynia. [161] W przebiegu miażdżycy wyróżnia się trzy fazy: inicjacji, progresji i powikłań, czyli np. pęknięcie blaszki miażdżycowej.

Inicjacja miażdżycy

Czynnikiem inicjującym tworzenie blaszki miażdżycowej jest uszkodzenie śródbłonna. Dotychczas udowodniono, że proces ten zapoczątkowuje hipercholesterolemia, a właściwie nadmiar utlenionych cząstek LDL. Wolne rodniki tlenowe przyczyniają się do zwiększenia eliminacji NO z ustroju. Zaburzone zostają

procesy, na które wpływa NO: rozkurcz naczyń, hamowanie proliferacji mięśni gładkich i syntezy macierzy pozakomórkowej, działanie przeciwzapalne. Nadtlenki lipidów hamują także syntezę prostacykliny, związku, który również służy rozszerzaniu naczyń krwionośnych i zapobiega powstawaniu zakrzepów płytkowych. Na zmienionych komórkach śródbłona pod wpływem TNF α , IL 1 β i utlenionych cząstek LDL dochodzi do zwiększonej ekspresji adhezyn, szczególnie VCAM-1. Skutkuje to adhezją monocytów i limfocytów do komórek śródbłona i dalszym ich przechodzeniem pod wpływem czynników chemotaktycznych do mięśniówki naczyń. Monocyty w błonie wewnętrznej przekształcają się w makrofagi, a te po internalizacji zmodyfikowanych lipoprotein (za pomocą receptorów zmiatających) w komórki piankowate. Tak w ścianie naczyń powstaje zmiana w postaci pasma tłuszczowego. [162]

Progresja miażdżycy

Pod wpływem płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF), endoteliny 1, trombiny i angiotensyny II dochodzi do przechodzenia komórek mięśni gładkich z błony środkowej do błony wewnętrznej. Tam komórki mięśni gładkich się mnożą, produkują ponadto cytokiny prozapalne i białka macierzy pozakomórkowej. Proteoglikany macierzy umożliwiają przyleganie i przeżycie komórek mięśni gładkich w blaszce, wiążą wnikające lipoproteiny oraz zwiększają ich wrażliwość na oksydacyjną modyfikację i glikację. Wszystkie rodzaje komórek obecne w blaszce miażdżycowej, szczególnie makrofagi, komórki mięśni gładkich i limfocyty T są bardziej podatne na apoptozę. Komórki apoptotyczne aktywnie stymulują proces zapalny oraz są silnie trombogene. Płytki krwi uczestniczą we wszystkich etapach rozwoju blaszki miażdżycowej. W obrębie blaszki tworzą się ponadto nowe, kruche naczynia, które są często źródłem wylewów krwi do jej wnętrza. [163]

Destabilizacja blaszki miażdżycowej

Jedną z przyczyn destabilizacji i pęknięcia blaszki miażdżycowej jest jej kalcyfikacja. [160] Wraz z rozwojem blaszki może dojść do jej wapnienia, przypominającego proces kościotworzenia. W przeciwieństwie do hipotezy, którą przedstawili Schinke i Karsenty [164], zgodnie, z którą kalcyfikacja naczyń krwionośnych i blaszek

miażdżycowych jest procesem pasywnym, który wymaga ciągłego hamowania, badania nad OPG dowodzą, że jest to proces aktywny, regulowany przez aktywatory i inhibitory kościotworzenia. [165] Niektóre komórki mięśni gładkich nabierają właściwości osteoblastów i wydzielają zwiększone ilości białek morfogenetycznych kości sprzyjających kalcyfikacji (bone morphogenic protein BMP): BMP 2, BMP 4, BMP 6. Powstawanie osteoklastów również w obrębie blaszki miażdżycowej hamuje osteoprotegeryna. W blaszce obecna jest także osteopontyna, hamująca wapnienie i sprzyjająca powstawaniu komórek żernych rozpuszczających złogi wapnia. Inhibitory kościotworzenia w sposób ciągły chronią naczynia krwionośne, podczas, gdy obecność aktywatorów doprowadza do zaburzenia równowagi i kalcyfikacji blaszki miażdżycowej. Nasilenie procesu kalcyfikacji blaszki miażdżycowej sprzyja tworzeniu większej liczby połączeń pomiędzy elastyczną a sztywną powierzchnią blaszki, które sprzyjają jej pękaniu.

Stan aktualnej wiedzy na temat procesu aterogenezy nie pozwala jednak w pełni uzasadnić podwyższonych stężeń OPG u osób ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym lub na etapie uszkodzeń subklinicznych. Nie jest poznana także jej rola we wczesnych etapach rozwoju miażdżycy.

OPG a miażdżycyca

OPG produkowana jest przez wiele tkanek, w układzie sercowo-naczyniowym spotykamy ją w sercu, tętnicach i żyłach. Ekspresję OPG stwierdzono na komórkach śródbłonna i komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Ze względu na olbrzymią powierzchnię śródbłonna w organizmie ludzkim komórki naczyń krwionośnych są istotnym źródłem krążącej w układzie krwionośnym OPG. Zwiększona ekspresja OPG w układzie krwionośnym może odzwierciedlać uszkodzenie śródbłonna, przerost błony wewnętrznej, przerost mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych lub zaawansowaną kalcyfikację blaszki miażdżycowej. [125] Olesen i wsp. badali stężenie OPG w ekstrakcie tkankowym z aorty piersiowej pobranej w trakcie sekcji 21 zwłok chorych na cukrzycę. Określali także ekspresję mRNA dla OPG w hodowli komórek z błony środkowej aorty. Stężenia OPG w błonie środkowej pobranych tęnic od chorych z cukrzycą były wyższe w odniesieniu do

grupy kontrolnej. Dodanie TNF α do hodowli komórek błony środkowej spowodowało znaczące zwiększenie syntezy OPG. [166]

Obserwowano również, że stężenia miejscowe OPG w obrębie usuniętych blaszek miażdżycowych z tętnic szyjnych pacjentów z objawami miażdżycy były wyższe, niż u pacjentów bezobjawowych. [95]

Być może w interpretacji wyników badań pomocne będzie określenie wzajemnych relacji wszystkich elementów szlaku sygnałowego OPG/RANKL/RANK. OPG obecna jest w zdrowych, nie zmienionych miażdżycowo tętnicach, podczas gdy RANKL i RANK w zdrowych naczyniach są nieoznaczalne. [167] Natomiast na etapie zarówno wczesnych, jak i zaawansowanych zmian miażdżycowych w tętnicach szyjnych i w aorcie brzusznej dochodzi do ekspresji zarówno OPG, jak i RANKL. [95, 168, 169]

Sandberg i wsp. pobierali materiał zakrzepowy z tętnic wieńcowych 6 pacjentów ze świeżym zawałem serca, w pobranym materiale stwierdzili obecność OPG, RANK i RANKL. Sugerować to może udział szlaku sygnałowego OPG/RANK/RANKL w destabilizacji blaszki miażdżycowej. [170]

Na produkcję OPG i RANKL przez komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych wpływ mają cytokiny prozapalne, takie jak: TNF α czy IL1 β . [64] Związek OPG ze stanem zapalnym potwierdzają badania ukazujące zmniejszenie stężenia OPG w trakcie terapii anty TNF. [171]

Rola OPG w procesach zachodzących w naczyniach krwionośnych nie jest do końca poznana, ale wiadomo, że zależy od interakcji z RANKL i wzajemnie modulowana jest przez proces zapalny, osteogenezy i apoptozy.

Dokładny mechanizm wpływu OPG na układ naczyniowy pozostaje nieznan, a hipotezy uzasadniające ten wpływ mogą być różne. Istnieją rozbieżności na temat wpływu OPG na układ krążenia - według jednych prac może być on korzystny, według innych niekorzystny.

Wiadomo, że do rozwoju i postępu miażdżycy przyczyniają się mediatory stanu zapalnego, a ekspresja OPG w ścianie naczyń jest stymulowana przez takie cytokiny prozapalne, jak: TNF α czy IL1 β .

Z drugiej strony jednak wyższe stężenia OPG w surowicy krwi mogą na zasadzie mechanizmu zwrotnego hamować progresję miażdżycy, szczególnie, że OPG blokuje ligand indukujący apoptozę zależną od czynnika martwicy nowotworu TNF

(TRAIL). Apoptoza indukowana poprzez TRAIL może inicjować rozwój miażdżycy – obumarłe komórki stanowią podłoże do rozpoczęcia procesu kalcyfikacji. OPG natomiast jako czynnik hamujący apoptozę może być potencjalnym kontrregulatorem rozwoju miażdżycy. [168]

7.6. Jak możemy zmniejszyć stężenie OPG? Kliniczne aspekty

Szereg obserwacji dotyczących potencjalnych możliwości wpływania na stężenia OPG pochodzi z badań oceniających drogi oddziaływania leków w terapii dyslipidemii, choroby wieńcowej, nadciśnienia tętniczego czy cukrycy. W ten sposób próbuje się tłumaczyć również dodatkowe korzyści uzyskiwane w trakcie leczenia niektórymi grupami leków.

Udowodniono, że statyny obniżają (indukowaną TNF α) produkcję OPG przez komórki śródbłonna i mięśni gładkich naczyń krwionośnych w badaniach *in vitro*. Przyczyniają się do zahamowania kalcyfikacji komórek naczyń krwionośnych, jednocześnie stymulując kalcyfikację komórek kości. [172] Badania kliniczne dowiodły również skuteczność statyn nie tylko w obniżaniu stężenia cholesterolu, ale również w redukcji klinicznych powikłań miażdżycy. [173]

Wspomnieć tylko dla porządku należy, że niekwestionowane miejsce w terapii zespołu metabolicznego i jego powikłań zajmuje stosowanie zdrowej diety oraz aktywność fizyczna. Zdrowy styl życia pozostaje interwencją terapeutyczną tym skuteczniejszą im wcześniej zostanie wdrożony. Największe korzyści dla zdrowia zarówno całej populacji, jak i jednostki ma przecież zawsze profilaktyka.

7.7. Czy OPG możemy traktować jako marker prognostyczny?

Czy OPG znajdzie swoje miejsce w stratyfikacji globalnego ryzyka i określenia intensywności działania medycznego? Jakie warunki powinien spełniać marker przydatny w praktyce klinicznej? Kiedy OPG mogłaby być wykorzystywana w tym celu?

Zgodnie z wytycznymi Amerykańskiego Towarzystwa Kardiologicznego marker powinien posiadać następujące cechy: możliwość standaryzacji oznaczenia i kontrolowania zmienności pomiaru, niezależność od uznanych czynników ryzyka,

związek z klinicznymi punktami końcowymi w badaniach obserwacyjnych i dużych badaniach klinicznych, istnienie norm populacyjnych ukierunkowujących interpretację wyników, zdolność poprawy całkowitej predykcji ponad tę wynikającą z tradycyjnych czynników ryzyka, uogólnienie wyników dla różnych grup populacyjnych, możliwa do przyjęcia cena testów. [174]

W świetle przedstawionych wyżej danych, określenie czy osteoprotegeryna zostanie uznana za marker prognostyczny zdarzeń sercowo-naczyniowych wymaga dalszych dowodów z badań.

8. Wnioski:

1. Podwyższone stężenia osteoprotegeryny korelują ściśle z parametrami antropometrycznymi chorych z zespołem metabolicznym oraz insulinoopornością mierzoną wskaźnikiem HOMA. Uwzględniając znaną rolę insulinooporności w rozwoju miażdżycy można sugerować iż osteoprotegeryna wpisuje się w przemiany metaboliczne w rozwoju miażdżycy.
2. Stwierdzona zależność pomiędzy stężeniem osteoprotegeryny a stężeniem hsCRP może sugerować zapalną etiologię procesu miażdżycowego.
3. Obecny etap badań nie pozwala ostatecznie rozstrzygnąć roli osteoprotegeryny w rozwoju miażdżycy, bądź też przypisać osteoprotegerynie jedynie znaczenia w procesie kalcyfikacji naczyń.
4. Nie wykazano zależności pomiędzy wyższymi stężeniami osteoprotegeryny a wyższymi wartościami IMT u chorych z zespołem metabolicznym.

9. Streszczenie

Szacuje się, że jedna czwarta populacji ludzi dorosłych na świecie spełnia kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego, są oni obciążeni zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym. Wskaźnikami ryzyka wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego są między innymi grubość kompleksu intima-media (IM) oraz stężenie osteoprotegeryny (OPG).

Celem pracy była ocena stężenia osteoprotegeryny i grubości kompleksu IM u osób z zespołem metabolicznym. Poszukiwano także zależności stężenia osteoprotegeryny od grubości kompleksu IM, parametrów antropometrycznych, insulinooporności oraz przewlekłego stanu zapalnego.

Materiał Do badania zakwalifikowano 70 pacjentów z zespołem metabolicznym, grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników.

Metody W obu grupach przeprowadzono pełne badanie podmiotowe i przedmiotowe, oceniono parametry antropometryczne: wskaźnik masy ciała (BMI), wskaźnik talia/biodra (WHR) oraz metodą bioimpedancji elektrycznej procentową zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie (%FAT). Wykonano podstawowe badania laboratoryjne. Stężenie insuliny oznaczono przy użyciu metody radioimmunometrycznej, insulinooporność oznaczono jako wskaźnik insulinooporności HOMA. Stężenie osteoprotegeryny oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA. Ocena grubości kompleksu IM wykonana została metodą ultrasonograficzną. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy programu Statistica 6.0 PL for Windows firmy Stat-Soft Inc.

Wyniki Pacjentów z zespołem metabolicznym charakteryzowały: wyższe stężenia insuliny, większy wskaźnik insulinooporności HOMA, większe stężenia hsCRP i osteoprotegeryny oraz większa grubość kompleksu IM. Zaobserwowano istotne statystycznie korelacje stężenia OPG od masy ciała, WHR, stężenia wysokoczułego białka C reaktywnego (hsCRP), stężenia insuliny i wskaźnika insulinooporności HOMA. Uzyskane wartości IMT korelowały z masą ciała, obwodem pasa i stężeniem insuliny.

Wnioski

1. Podwyższone stężenia osteoprotegeryny korelują ściśle z parametrami antropometrycznymi chorych z zespołem metabolicznym oraz

insulinoopornością mierzoną wskaźnikiem HOMA. Uwzględniając znaną rolę insulinooporności w rozwoju miażdżycy można sugerować iż osteoprotegeryna wpisuje się w przemiany metaboliczne w rozwoju miażdżycy.

2. Stwierdzona zależność pomiędzy stężeniem osteoprotegeryny a stężeniem hsCRP może sugerować zapalną etiologię procesu miażdżycowego.
3. Obecny etap badań nie pozwala ostatecznie rozstrzygnąć roli osteoprotegeryny w rozwoju miażdżycy, bądź też przypisać osteoprotegerynie jedynie znaczenia w procesie kalcyfikacji naczyń.
4. Nie wykazano zależności pomiędzy wyższymi stężeniami osteoprotegeryny a wyższymi wartościami IMT u chorych z zespołem metabolicznym.

Summary

It is estimated that one quarter of the adult population in the world meets the criteria for diagnosis of metabolic syndrome. They are at increased cardiovascular risk. Indicators of the risk of cardiovascular events among others are: thickness of intima-media (IM) complex and serum osteoprotegerin (OPG) concentration. **The aim** of this study was to evaluate the concentration of the osteoprotegerin and thickness of IM among patients with metabolic syndrome. The relationship between osteoprotegerin concentration and IM thickness, anthropometric parameters, insulin resistance and chronic inflammation were also studied.

Material: 70 patients with metabolic syndrome were qualified for the study. The control group consisted of 20 healthy volunteers.

Methods: In both groups were performed full physical examination, anthropometric parameters were assessed: body mass index (BMI), waist/hip ratio (WHR) and the percentage of body fat (% FAT) using electrical bioimpedancy method. Routine laboratory tests were performed. Insulin levels were determined by radioimmunoassay, insulin resistance was marked as HOMA index. Osteoprotegerin concentration was determined by ELISA. Evaluation of IM thickness was performed using ultrasound. The results were statistically analyzed using the Statistica 6.0 PL for Windows from Stat-Soft Inc.

Results: Patients with metabolic syndrome were characterized by: higher insulin levels, higher HOMA index, higher concentrations of high sensitive C-reactive protein (hsCRP) and osteoprotegerin and increased thickness of the IM complex. There was a statistically significant correlation between OPG concentrations and body weight, WHR, serum hsCRP and insulin concentrations and HOMA index. The obtained values of IMT correlated with body weight, waist circumference and insulin levels.

Conclusions:

1. Increased levels of osteoprotegerin correlate closely with anthropometric parameters among patients with metabolic syndrome and insulin resistance measured by HOMA. Taking into account the known role of insulin resistance in the development of atherosclerosis, it may suggest that osteoprotegerin is part of the metabolic changes in the development of atherosclerosis.

2. The correlation between hsCRP and serum OPG concentration may suggest an inflammatory etiology of atherosclerosis.
3. The current stage of research doesn't allow to determine conclusively the role of osteoprotegerin in the development of atherosclerosis, or to assign OPG the role only in the process of vascular calcification.
4. No significant correlation between higher serum osteoprotegerin concentration and the value of IMT among patients with metabolic syndrome was found.

10. Piśmiennictwo

1. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation presented at: the World Health Organization. June 3 – 5, 1997. Geneva, Switzerland,
2. WHO 2006 Fact sheet no 31: Obesity and overweight
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>,
3. Obesity the global epidemic.
<http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/>,
4. Micciolo R., Di Francesco V., Fantin F., Canal L., Harris T.B., Bosello O., Zamboni M.: Prevalence of overweight and obesity in Italy (2001-2008): is there a rising obesity epidemic? *Ann. Epidemiol.* 2010; 20(4): 258-264,
5. Musta A., Spadano J., Coakley E.H. et al.: The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 1999, 282, 1523-1529,
6. Flegal K.M., Graubard B.I., Williamson D.F., Gail M.H.: Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA*. 2005 Apr 20;293(15):1861-1867,
7. Huang P.L.: A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* 2009; 2(5-6): 231-237,
8. Pacholczyk M., Ferenc T., Kowalski J.: The metabolic syndrome. Part I: definitions and diagnostic criteria for its identification. Epidemiology and relationship with cardiovascular and type 2 diabetes risk. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2008; 62: 530-542,
9. Wierzbicka-Chmiel J., Mizia-Stec K., Chmiel A., Gąsior Z.: Zespół metaboliczny u osób niskiego ryzyka sercowo-naczyniowego według skali SCORE a czynnościowa i strukturalna przebudowa tętnic. *Pol. Przegl. Kardiol.* 2008; 10(3): 197-201,
10. The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome
http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf,
11. Meigs J.B.: Epidemiology of the metabolic syndrome, 2002. *Am. J. Manag. Care.* 2002; 8: 283-292,
12. Wyrzykowski B., Zdrojewski T., Sygnowska E., Biela U., Drygas W., Tykarski A., Tendera M., Broda G.: Epidemiologia zespołu metabolicznego w Polsce. Wyniki programu WOBASZ. *Kardiol. Pol.* 2005; 63(6 Suppl 4): S641-644,
13. Wyrzykowski B., Zdrojewski T., Bandosz P.: Zespół metaboliczny w Polsce. *Kardiol. Pol.* 2005; 62 (2): 30-35,
14. Broda G., Szcześniewska D., Rywik S.: Częstość występowania zespołu metabolicznego w populacji osób dorosłych Warszawy. *Medycyna Metab.* 2003; 7: 225-229,

15. Kwaśniewska M., Kaleta D., Dziankowska-Zaborszczyk E., Drygas W.: Healthy behaviours, life style patterns and sociodemographic determinants of the metabolic syndrome. *Centr. Eur. J. Public Health*. 2009; 17(1): 14-19,
16. <http://www.termedia.pl/Jaki-jest-stan-zdrowia-Polakow-wedlug-NATPOL-2011-4624.html>,
17. Reaven G.M.: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37: 1595-1607,
18. Wang C.C., Goalstone M.L., Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. 2004; 53(11): 2735-2740,
19. Kangduk Ch., Ypung-Bum K.: Molecular mechanizm of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J. Intern. Med*. 2010; 25: 119-129,
20. Ferrannini E., Mari A.: How to measure insulin sensitivity. *J. Hypertens*. 1998; 16: 895-906,
21. Bjornholm M., Al-Khalili L., Dicker A., Naslund E., Rossner S., Zierath J., Arner P.: Insulin signal transduction and glucose transport in human adipocytes: effects of obesity and low calorie diet. *Diabetologia*. 2002, 45 (8): 1128-1135,
22. Duvnjak L., Duvnjak M.: The metabolic syndrome – an ongoing story. *J Physiol Pharmacol*. 2009; 60, Suppl 7, 19 – 24,
23. Zeyda M., Stulning T.M.: Obesity, inflammation and insulin resistance – a mini – review. *Gerontology*. 2009; 55: 379-386,
24. Bogdański P., Chyrek R., Pupek-Musialik D., Jabłeczka A.: Evaluation of selected acute phase proteins in patients with metabolic syndrome. *Pol. Merkuriusz Lek*. 2006; 21: 12-14,
25. Cymerys M., Chyrek R., Bogdański P., Łącki J., Pupek-Musialik D.: Evaluation of acute phase proteins in hypertensive and obese patients. *Pol. Merkuriusz Lek*. 2003; 15: 352-354,
26. Zeyda M., Farmer D., Todoric J., Aszmann O., Speiser M., Gyori G., Zlabinger G.J., Stulning T.M.: Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes*. 2007; 31: 1420-1428,
27. Fruhbeck G., Gomez-Ambrosi J., Muruzabal F., Burrell M.: The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2001, 280 (6), 827-847,
28. Wellen K.E., Hotumisliligil G.S.: Obesity – induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1785 – 1788,

29. Miczke A., Bryl W., Szulińska M., Pupek-Musialik D.: The role of adiponectin in pathogenesis of insulin resistance and metabolic syndrome. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2005; 19: 723-726,
30. Miczke A., Pupek-Musialik D.: Leptin and obesity. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2000; 8: 109-112,
31. Musialik K. : Czy produkty wisceralnej tkanki tłuszczowej — rezystyna i TNF- α — modulują wartości ciśnienia tętniczego? *Nadciśnienie Tętnicze* 2011; 6: 347-355,
32. Foremska-Iciek J.: Ocena stężenia wybranych adipocytokin u chorych z zespołem metabolicznym i nadciśnieniem tętniczym. 2011; Rozprawa doktorska,
33. Matsuda M., Shimomura I., Sata M., Arita Y., Nishida M., Maeda N., Kumada M., Okamoto Y., Nagaretani H., Nishizawa H., Kishida K., Komuro R., Ouchi N., Kihara S., Nagai R., Funahashi T., Matsuzawa Y.: Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(40): 37487-37491,
34. Musialik K. The influence of chosen adipocytokines on blood pressure values in patients with metabolic syndrome. *Kardiol. Pol.* 2012; 70: 1237-1242,
35. Loos R.J., Bouchard C.: FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obes. Rev.* 2008; 9(3): 246-250,
36. Belcaro G., Laurora G., Cesarone M.R., De Sanctis M.T., Renton S., Chong L.C.: Evaluation of arteriosclerosis progression with ultrasonic biopsy and intima-media thickness measurements. *Vasa.* 1993; 22: 15-21,
37. Pignoli P., Tremoli E., Poli A., Oreste P., Paoletti R.: Intimal plus medial thickness of the arteria Wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation.* 1986; 74(6): 1399-1406,
38. Touboul P.J., Hennerici M.G., Meairs S., Adams H., Amarenco P., Desvarieux M., Ebrahim S., Fatar M., Hernandez Hernandez R., Kownator S., Prati P., Rundek T., Taylor A., Bornstein N., Csiba L., Vicaut E., Woo K.S., Zannad F.; Advisory Board of the 3rd Watching the Risk Symposium 2004, 13th European Stroke Conference. Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc. Dis.* 2004; 18: 346-349,
39. Bots M.L., Hoes A.W., Koudstaal P.J., Hofman A., Grobbee D.E.: Common Carotid Intima-Media Thickness and Risk of Stroke and Myocardial Infarction: The Rotterdam Study. *Circulation.* 1997; 96: 1432-1437,

40. Chambless L.E., Folsom A.R., Sharrett A.R., Sorlie P., Couper D., Szklo M., Nieto F.J.: Coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *J. Clin. Epidemiol.* 2003; 56(9): 880-890,
41. Lorenz M.W., Markus H.S., Bots M.L., Rosvall M., Sitzer M.: Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systemic review and meta-analysis. *Circulation*, 2007; 115: 459-467,
42. Novo S., Carità P., Corrado E., Muratori I., Pernice C., Tantillo R., Novo G.: Preclinical carotid atherosclerosis enhances the global cardiovascular risk and increases the rate of cerebro- and cardiovascular events in a five-year follow-up. *Atherosclerosis*. 2010; 211(1): 287-290,
43. Rosvall M., Janzon L., Berglund G., Engstrom G., Hedblad B.: Incidence of stroke is related to carotid IMT even in the absence of plaque. *Atherosclerosis*, 2005; 179: 325-331,
44. O'Leary D.H., Polak J.F., Kronmal R.A., Manolio T.A., Burke G.L., Wolfson S.K. Jr.: Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke In older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340 (1): 14-22,
45. Giuseppe M., Guido G.: The New European Society of Hypertension/European Society of Cardiology (ESH/ESC) Guidelines, *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 2008; 2(1): 5-12,
46. Brendan F. Boyce, Lianping Xing: Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008, 473: 139-146,
47. Dzedzic-Gocławska A., Tyszkiewicz J., Uhrynowska-Tyszkiewicz I.: Wybrane mechanizmy sterujące procesem przebudowy tkanki kostnej wpływające na przebieg osteoporozy. *Nowa Klin.* 2000, 7, 704-712,
48. Suda T., Takahoshi N., Martin T.J.: Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* 1992, 13, 66-80,
49. Rodan G.A., Martin T.J.: Role of osteoblasts In hormonal control of bone resorption: a hypothesis. *Calcif. Tissue Int.* 1981, 33: 349-351,
50. Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang M.-S., Lothy R., Nguyen H.Q., Wooden S., Bennett L., Boone T. et al.: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved In the regulation of bone density. *Cell.* 1997, 89: 309-319,
51. Tsuda E., Goto M., Mochizuki S., Yano K., Kobayashi F., Morinaga T., Higashio K.: Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 234(1): 137-142,

52. Yamaguchi K., Masahiko K., Goto M., Kobayashi F., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K.: Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor, *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 5117-5123,
53. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Mochizuki S.I., Yano K., Fujise N., Sato Y., Goto M., Yamaguchi K., Kuriyama M., et al.: Identify of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 1998, 139: 1329-1337,
54. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinoshita M., Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A. et al.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis – inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, 95: 3597-3602,
55. Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S. et al.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998, 93: 165-176,
56. Anderson D.M., Maraskovsky E., Bilingsley 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,
57. Sobańska I., Odrowąż-Sypniewska G., Kuligowska M.: Wpływ płci i wieku na stężenie osteoprotegeryny we krwi. *Wiad. Lek.* 2007, 60 (5-6): 281-285,
58. Morinaga T., Nakagawa N., Yasuda H., Tsuda E., Higashio K.: Cloning and characterization of gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *Eur. J. Biochem.* 1998, 254: 685-691,
59. Udagawa N., Takahashi N., Yasuda H., Mizuno A., Itoh K., Ueno Y., Shinki T., Gillespie M.T., Martin T.J., Higashio K., Suda T.: Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology.* 2000; 141(9): 3478-3484,
60. Armstrong A.P., Tometsko M.E., Glaccum M., Sutherland C.L., Cosman D., Dougall W.C.: A RANK/TRAF6 – dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J. Biol. Chem.* 2002, 277 (46): 44347-44356,
61. Xing L., Bushnell T.P., Carlson L., Tai Z., Tondravi M., Siebenlist U., Young F., Boyce B.F.: NF-kappaB p50 and p52 expression is not required for RANK-expressing osteoclast progenitor formation but is essential for RANK – and cytokine – mediated osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 2002, 17 (7): 1200-1210,
62. Matsumoto M., Sudo T., Saito T., Osada H., Tsujimoto M.: Involvement of p38 mitogen – activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by

- receptor activator of NF-kappa B ligand (RANK). *J. Biol. Chem.* 2000, 275 (40): 31155-31161,
63. David J.P., Sabapathy K., Hoffmann O., Idarraga M.H., Wagner E.F.: JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and – independent mechanisms. *J. Cell Sci.* 2002, 115 (Pt22): 4317-4325,
64. Glantschnig H., Fisher J.E., Wesolowski G., Rodan G.A., Reszka A.A.: M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ.* 2003; 10(10): 1165-1177,
65. Miyazaki T., Katagiri H., Kanegae Y., Takayanagi H., Sawada Y., Yamamoto A., Pando M.P., Asano T., Verma I.M., Oda H., Nakamura K., Tanaka S.: Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts. *J. Cell Biol.* 2000; 148(2): 333-342,
66. Emery J.G., McDonnell P., Burke M.B., Deen K.C., Lyn S., Silverman C., Dul E., Appelbaum E.R., Eichman C., DiPrinzio R., Dodds R.A., James I.E., Rosenberg M., Lee J.C., Young P.R.: Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(23): 14363-14367,
67. Vitovski S., Phillips J.S., Sayers J., Croucher P.I.: Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(43): 31601-31609,
68. Wong B.R., Josien R., Lee S.Y., Sauter B., Li H.L., Steinman R.M., Choi Y.: TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.* 1997, 186(12): 2075-2080,
69. Collin-Osdoby P., Rothe L., Anderson F., Nelson M., Maloney W., Osdoby P.: Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (23) 20659-20672,
70. Zannettino A.C., Holding C.A., Diamond P., Atkins G.J., Kostakis P., Farrugia A., Gamble J., To L.B., Findlay D.M., Haynes D.R.: Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J. Cell Physiol.* 2005, 204(2): 714-723,
71. Panizo S., Cardus A., Encinas M., Parisi E., Valcheva P., López-Ongil S., Coll B., Fernandez E., Valdivielso J.M.: RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ. Res.* 2009, 104(9): 1041-1048,

72. Cross S.S., Yang Z., Brown N.J., Balasubramanian S.P., Evans C.A., Woodward J.K., Neville-Webbe H.L., Lippitt J.M., Reed M.W., Coleman R.E., Holen I.: Osteoprotegerin (OPG) -- a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis? *Int. J. Cancer.* 2006, 118(8): 1901-1908,
73. Zauli G., Corallini F., Bossi F., Fischetti F., Durigutto P., Celeghini C., Tedesco F., Secchiero P.: Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood.* 2007, 110(2): 536-543,
74. Ben-Tal Cohen E., Hohensinner P.J., Kaun C., Maurer G., Huber K., Wojta J.: Statins decrease TNF-alpha-induced osteoprotegerin production by endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 2007, 73(1): 77-83,
75. Zhang J., Fu M., Myles D., Zhu X., Du J., Cao X., Chen Y.E.: PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. *FEBS Lett.* 2002, 521(1-3): 180-184,
76. Secchiero P., Corallini F., Pandolfi A., Consoli A., Candido R., Fabris B., Celeghini C., Capitani S., Zauli G.: An increased osteoprotegerin serum release characterizes the early onset of diabetes mellitus and may contribute to endothelial cell dysfunction. *Am. J. Pathol.* 2006; 169(6): 2236-2244,
77. Bucay N., Sarosi I., Dunstan C.R., Morony S., Tarpley J., Capparelli C., Scully S., Lin Tan H., Xu W., Lacey D.L., Boyle W.J., Simonet W.S.: Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998, 12: 1260-1268,
78. Min H., Morony S., Sarosi I., Dunstan C.R., Capparelli C., Scully S., Van G., Kaufman S., Kostenuik P.J., Lacey D.L., Boyle W.J., Simonet W.S.: Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J. Exp. Med.* 2000, 192(4): 463-474,
79. Price P.A., June H.H., Buckley J.R., Williamson M.K.: Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21(10): 1610-1616,
80. Bennett B.J., Scatena M., Kirk E.A., Rattazzi M., Varon R.M., Averill M., Schwartz S.M., Giachelli C.M., Rosenfeld M.E.: Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, 26(9): 2117-2124,
81. Orita Y., Yamamoto H., Kohno N., Sugihara M., Honda H., Kawamata S., Mito S., Soe N.N., Yoshizumi M.: Role of osteoprotegerin in arterial calcification: development of new animal model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27(9): 2058-2064,

82. Morony S., Tintut Y., Zhang Z., Cattley R.C., Van G., Dwyer D., Stolina M., Kostenuik P.J., Demer L.L.: Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr(-/-)* mice. *Circulation*. 2008, 117(3): 411-420,
83. Bekker P.J. Holloway D., Nakanishi A., Arrighi M., Leese P.T., Dunstan C.R.: The effect of a single dose of osteoprotegerin In postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 2001, 16 (2): 348-360,
84. Body J.J., Greipp P., Coleman R.E., Facon T., Geurs F., Femand J.P. Harousseau J.L., Lipton A., Mariette X., Williams C.D., Nakanishi A., Holloway D., Martin S.W., Dunstan C.R., Bekker P.J.: A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer*. 2003, 97 (3): 887-892,
85. Bekker P.J., Holoway D.L., Rasmussen A.S., Murphy R., Martin S.W., Leese P.T., Holmes G.B., Dunstan C.R., DePaoli A.M.: A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 2004, 19 (7), 1059-1066,
86. Miller P.D., Wagman R.B., Peacock M., Lewiecki E.M., Bolognese M.A., Weinstein R.L., Ding B., San Martin J., McClung MR.: Effect of Denosumab on Bone Mineral Density and Biochemical Markers of Bone Turnover: Six-Year Results of a Phase 2 Clinical Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011. 96(2): 394-402,
87. Tankò L.B., Bagger Y.Z., Christiansen C.: Low bone mineral density in the hip as a marker of advanced atherosclerosis in elderly women. *Calcif. Tissue Int.* 2003, 73(1): 15-20,
88. Soufi M., Schoppet M., Sattler A.M., Herzum M., Maisch B., Hofbauer L.C., Schaefer J.R.: Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, 89(8): 3764-3768,
89. Brändström H., Stiger F., Kahan T., Melhus H., Nyström F., öHman K.P., Malmqvist K., Lind L., Kindmark A.: A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the osteoprotegerin gene is related to intima-media thickness of the carotid artery in hypertensive patients. The Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol (SILVHIA). *Blood Press.* 2004, 13(3): 152-157,
90. Jono S., Ikari Y., Shioi A., Mori K., Miki T., Hara K., Nishizawa Y.: Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation*. 2002, 106(10): 1192-1194,
91. Schoppet M, Sattler A.M., Schaefer J.R., Herzum M., Maisch B., Hofbauer L.C.: Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003, 88(3): 1024-1028,

92. Palazzuoli A., Izzello V., Calabro A., Gallotta M., Martini G., Quatrini I., Campagna M.S., Franci B., Nuti R.: Osteoprotegerin and B-type natriuretic peptide in non-ST elevation acute coronary syndromes: Relation to coronary artery narrowing and plaques number. *Clinica Chimica Acta*. 2008; 391: 74-79,
93. Rhee E.J., Lee W.Y., Kim S.Y., Kim B.J., Sung K.C., Kim B.S., Kang J.H., Oh K.W., Oh E.S., Baek K.H., Kang M.I., Woo H.Y., Park H.S., Kim S.W., Lee M.H., Park J.R.: Relationship of serum osteoprotegerin levels with coronary artery disease severity, left ventricular hypertrophy and C-reactive protein. *Clin. Sci. (Lond)*. 2005,108(3): 237-243,
94. Ren M.Y., Sui S.-J., Zhang Y., Xu F.-Y., Xu X.-Q., Zhao J.-J., Du Y.-M., Liu W.-H.: Increased plasma osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of acute coronary syndrome. *Acta Cadiol*. 2008, 63(5): 615-622,
95. Golledge J., McCann M., Mangan S., Lam A., Karan M.: Osteoprotegerin and osteopontin are expressed at high concentrations within symptomatic carotid atherosclerosis. *Stroke* 2004, 35, 1636-1641,
96. Omland T., Ueland T., Jansson A.M., Persson A., Karlsson T., Smith C., Herlitz J., Aukrust P., Hartford M., Caidahl K.: Circulating osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2008, 51(6): 627-633,
97. Ziegler S., Kudlacek S., Luger A., Minar E.: Osteoprotegerin plasma concentrations correlate with severity of peripheral artery disease. *Atherosclerosis*. 2005, 182, 175-180,
98. Guldiken B., Guldiken S., Turgut B., Turgut N., Demir M., Celik Y., Arikan E., Turgul A.: Serum osteoprotegerin levels in patients with acute atherothrombotic stroke and lacunar infarct. *Thromb. Res*. 2007, 120: 511-516,
99. Jensen J.K., Ueland T., Atar D., Gullestad L., Mickley H., Aukrust P., Januzzi J.L.: Osteoprotegerin concentrations and prognosis in acute ischaemic stroke. *J. Intern. Med*. 2010, 267 (4): 410-417,
100. Nybo M., Johnsen S.P., Dethlefsen C., Overvad K., Tjønneland A., Jørgensen J.O., Rasmussen L.M.: Lack of observed association between high plasma osteoprotegerin concentrations and ischemic stroke risk in a healthy population. *Clin. Chem*. 2008; 54(12): 1969-1974,
101. Abedin M., Omland T., Ueland T., Khera A., Aukrust P., Murphy S.A., Jain T., Gruntmanis U., McGuire D.K., de Lemos J.A.: Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas Heart Study). *Am. J. Cardiol*. 2007; 99(4): 513-518,

102. Semb A.G., Ueland T., Aukrust P., Wareham N.J., Luben R., Gullestad L., Kastelein J.J., Khaw K.T., Boekholdt S.M.: Osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and risk for coronary events: a nested case-control approach in the prospective EPIC-Norfolk population study 1993-2003. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009; 29(6): 975-980,
103. Lieb W., Gona P., Larson M.G., Massaro J.M., Lipinska I., Keaney J.F. Jr, Rong J., Corey D., Hoffmann U., Fox C.S., Vasan R.S., Benjamin E.J., O'Donnell C.J., Kathiresan S.: Biomarkers of the osteoprotegerin pathway: clinical correlates, subclinical disease, incident cardiovascular disease, and mortality. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30(9): 1849-1854,
104. Vik A., Mathiesen E.B., Brox J., Wilsgaard T., Njølstad I., Jørgensen L., Hansen J.B.: Serum osteoprotegerin is a predictor for incident cardiovascular disease and mortality in a general population: the Tromsø Study. *J. Thromb. Haemost.* 2011; 9(4): 638-644,
105. Report of a WHO Consultation on Obesity. Preventing and Managing the Global Epidemic. Division of noncommunicable Diseases. World Health Organization. Geneva 3-5 June 1997. WHO/NUT/NCD 1998,
106. Miller S., Carlson R., Fegelman E., Quinones J., Finley R.: A comparison of total body water analyses: bioelectric impedance analysis versus the tritiated water method. *J. Burn. Care Rehabil.* 1999, 20 (5), 363-366,
107. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.: Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. VOLUMED Wrocław 1998,
108. Wesołowski P., Wańkiewicz Z.: Insulinooporność metody rozpoznawania i następstwa kliniczne. *Nefrol. Dial. Pol.* 2011; 15, 243-246,
109. Guerrero-Romero F., Tamez-Perez H.E., González-González G. i wsp.: Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity in non-diabetic subjects with insulin resistance. A double-blind placebo-controlled randomized trial. *Diabetes Metab.* 2004; 30(3): 253-258,
110. Riccio S.A., House A.A., Spence J.D., Fenster A., Parraga G.: Carotid ultrasound phenotypes in vulnerable populations. *Cardiovasc. Ultrasound.* 2006. 13; 4: 44,
111. Małka G. (red.): Ultrasonografia dopplerowska - zastosowania kliniczne tom 1. Medipage, Warszawa 2003, wyd. 1,
112. Jayagopal V., Kilpatrick E.S., Holding S., Jennings P.E., Atkin S.L.: The biological variation of insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002. 87(4): 1560-1562,

113. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C.: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28(7): 412-419,
114. Gannagé-Yared M.H., Yaghi C., Habre B., Khalife S., Noun R., Germanos-Haddad M., Trak-Smayra V.: Osteoprotegerin in relation to body weight, lipid parameters insulin sensitivity, adipocytokines, and C-reactive protein in obese and non-obese young individuals: results from both cross-sectional and interventional study. *Eur. J. Endocrinol*. 2008; 158(3): 353-359,
115. Golledge J., Leicht A.S., Crowther R.G., Glanville S., Clancy P., Sangla K.S., Spinks W.L., Quigley F.: Determinants of endothelial function in a cohort of patients with peripheral artery disease. *Cardiology*. 2008; 111(1): 51-56,
116. Nabipour I., Kalantarhormozi M., Larijani B., Assadi M., Sanjdideh Z.: Osteoprotegerin in relation to type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Metabolism*. 2010; 59(5): 742-747,
117. 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(6): 681-686,
118. Oh E.S., Rhee E.J., Oh K.W., Lee W.Y., Baek K.H., Yoon K.H., Kang M.I., Yun E.J., Park C.Y., Choi M.G., Yoo H.J., Park S.W.: 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(1): 49-54,
119. Gannagé-Yared M.H., 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(6): 652-658,
120. Holecki M., Zahorska-Markiewicz B., Janowska J., Nieszporek T., Wojaczyńska-Stanek K., Zak-Gołab A., Wiecek A.: The influence of weight loss on serum osteoprotegerin concentration in obese perimenopausal women. *Obesity (Silver Spring)*. 2007; 15(8): 1925-1929,
121. Ugur-Altun B., Altun A., Gerenli M., Tugrul A.: The relationship between insulin resistance assessed by HOMA-IR and serum osteoprotegerin levels in obesity. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005; 68(3): 217-222,
122. Kim S.M., Lee J., Ryu O.H., Lee K.W., Kim H.Y., Seo J.A., Kim S.G., Kim N.H., Baik S.H., Choi D.S., Choi K.M.: Serum osteoprotegerin levels are associated

- with inflammation and pulse wave velocity. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2005; 63(5): 594-598,
123. Yaturu S., Rains J., Jain SK.: Relationship of elevated osteoprotegerin with insulin resistance, CRP, and TNF-alpha levels in men with type 2 diabetes. *Cytokine*. 2008; 44(1): 168-171,
124. O'Sullivan E.P., Ashley D.T., Davenport C. i wsp.: A comparison of osteoprotegerin with adiponectin and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) as a marker for insulin resistance. *Metabolism*. 2012. [Epub ahead of print],
125. 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(4): 549-543,
126. Antonini-Canterin F., La Carrubba S., Gullace G., Zito C., Di Bello V., Di Salvo G., Benedetto F., Novo S., Pezzano A., Perticone F., Balbarini A., Carerj S. Research Group of the Italian Society of Cardiovascular Echography: Association between carotid atherosclerosis and metabolic syndrome: results from the ISMIR study. *Angiology*. 2010; 61(5): 443-448,
127. Xu L., Jiang C.Q., Lam T.H., Lin J.M., Yue X.J., Cheng K.K., Liu B., Jin Y.L., Zhang W.S., Thomas G.N. Guangzhou Biobank Cohort Study-CVD: The metabolic syndrome is associated with subclinical atherosclerosis independent of insulin resistance: the Guangzhou Biobank Cohort Study-CVD. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2010; 73(2): 181-188,
128. Ahn M.S., Kim J.Y., Youn Y.J., Kim S.Y., Koh S.B., Lee K., Yoo B.S., Lee S.H., Yoon J., Park J.K., Choe K.H.: Cardiovascular parameters correlated with metabolic syndrome in a rural community cohort of Korea: the ARIRANG study. *J. Korean Med. Sci*. 2010 ; 25(7): 1045-1052,
129. Matoba Y., Inoguchi T., Suzuki S., Nasu S., Hashimoto T., Yanase T., Nawata H., Takayanagi R.: Impact of metabolic syndrome on the progression of Intima-Media Thickening in Japanese--a follow-up study. *Diabetes Res. Clin. Pract*. 2009; 86(3): 50-53,
130. Adolphe A., Cook L.S., Huang X.: A cross-sectional study of intima-media thickness, ethnicity, metabolic syndrome, and cardiovascular risk in 2268 study participants. *Mayo Clin. Proc*. 2009; 84(3): 221-228,
131. Guembe MJ, Toledo E, Barba J, Martínez-Vila E, González-Diego P, Irimia P, Díez J, Viñes JJ.: Association between metabolic syndrome or its components and asymptomatic cardiovascular disease in the RIVANA-study. *Atherosclerosis*. 2010; 211(2): 612-617,

132. Chen P.C., Chien K.L., Hsu H.C., Su T.C., Chang C.W., Sung F.C., Lee Y.T.: C-reactive protein and the metabolic syndrome correlate differently with carotid atherosclerosis between men and women in a Taiwanese community. *Metabolism*. 2008; 57(8): 1023-1028,
133. Pannacciulli N., De Pergola G., Ciccone M., Rizzon P., Giorgino F., Giorgino R.: Effect of family history of type 2 diabetes on the intima-media thickness of the common carotid artery in normal-weight, overweight, and obese glucose-tolerant young adults. *Diabetes Care*. 2003; 26(4): 1230-1234,
134. Bertoni A.G., Wong N.D., Shea S., Ma S., Liu K., Preethi S., Jacobs D.R. Jr, Wu C., Saad M.F., Szklo M.: Insulin resistance, metabolic syndrome, and subclinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care*. 2007; 30(11): 2951-2956,
135. Rutter M.K., Meigs J.B., Sullivan L.M., D'Agostino R.B. Sr, Wilson P.W.: Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 2005; 54(11): 3252-3257,
136. Koskinen J., Kähönen M., Viikari J.S., Taittonen L., Laitinen T., Rönnemaa T., Lehtimäki T., Hutri-Kähönen N., Pietikäinen M., Jokinen E., Helenius H., Mattsson N., Raitakari O.T., Juonala M.: Conventional cardiovascular risk factors and metabolic syndrome in predicting carotid intima-media thickness progression in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study. *Circulation*. 2009; 120(3): 229-236,
137. Haffner S.: Epidemiology of insulin resistance and its relation to coronary artery disease. *Am. J. Cardiol*. 1999, 84 (1), 11-14,
138. Howard G., O'Leary D., Zaccaro D., Haffner S., Rewers M., Hamman R. Selby J.V., Saad M.F., Savage P., Bergman R.: Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Circulation*. 1996, 93 (10), 1809-1817,
139. Meigs J., Mittleman M., Nathan D., Tofler G., Singer D., Murphy-Sheehy P., Lipinska I, D'Agostino R.B., Wilson P.W.: Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA*. 2000, 283 (2), 221-228,
140. Ridker P.M., Glynn R.J., Hennekens C.H.: C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation*. 1998;97(20): 2007-2011,
141. Ridker P.M., Buring J.E., Cook N.R., Rifai N.: C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*. 2003; 107(3): 391-397,

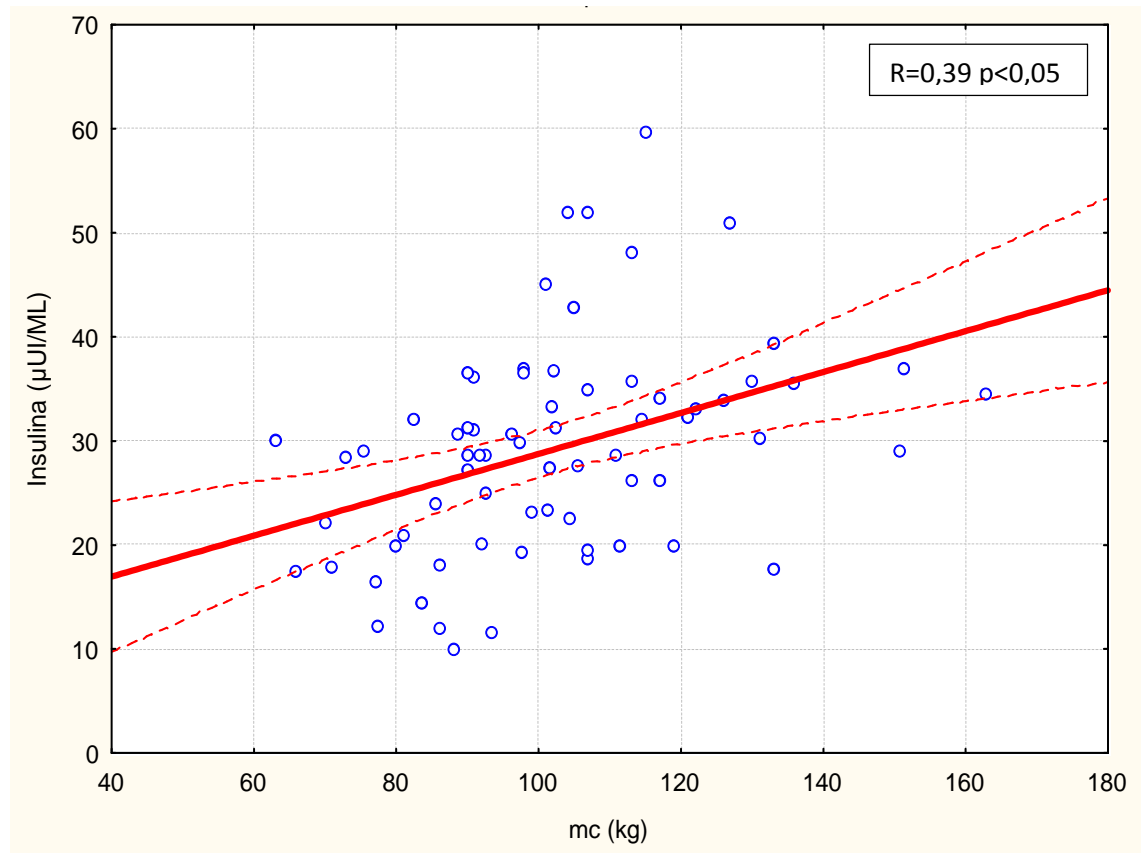
142. Ballantyne C.M., Hoogeveen R.C., Bang H., Coresh J., Folsom A.R., Chambless L.E., Myerson M., Wu K.K., Sharrett A.R., Boerwinkle E.: Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arch. Intern. Med.* 2005; 165(21): 2479-2484,
143. Downs J.R., Clearfield M., Weis S., Whitney E., Shapiro D.R., Beere P.A., Langendorfer A., Stein E.A., Kruyer W., Gotto A.M. Jr.: Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA.* 1998; 279(20): 1615-1622,
144. Koenig W., Khuseyinova N., Baumert J., Meisinger C.: Prospective study of high-sensitivity C-reactive protein as a determinant of mortality: results from the MONICA/KORA Augsburg Cohort Study, 1984-1998. *Clin. Chem.* 2008; 54(2): 335-342,
145. Eiriksdottir G., Aspelund T., Bjarnadottir K., Olafsdottir E., Gudnason V., Launer L.J., Harris T.B.: Apolipoprotein E genotype and statins affect CRP levels through independent and different mechanisms: AGES-Reykjavik Study. *Atherosclerosis.* 2006; 186(1): 222-224,
146. Ridker P.M., Wilson P.W., Grundy S.M.: Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? *Circulation.* 2004; 109: 2818-2825,
147. Yudkin J.S., Kumari M., Humphries S.E., Mohamed-Ali V.: Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis.* 2000; 148(2): 209-214,
148. Festa A., D'Agostino R. Jr, Howard G., Mykkänen L., Tracy R.P., Haffner S.M.: Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation.* 2000; 102(1): 42-47,
149. Freeman D.J., Norrie J., Sattar N., Neely R.D., Cobbe S.M., Ford I., Isles C., Lorimer A.R., Macfarlane P.W., McKillop J.H., Packard C.J., Shepherd J., Gaw A.: Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation.* 2001; 103(3): 357-362,
150. Pasceri V., Cheng J.S., Willerson J.T., Yeh E.T.: Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation.* 2001; 103: 2531–2534,
151. Verma S., Wang C.H., Li S.H., , Dumont A.S., Fedak P.W., Badiwala M.V., Dhillon B., Weisel R.D., Li R.K., Mickle D.A., Stewart D.J.: A self-fulfilling prophecy:

- C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*. 2002; 106: 913–919,
152. Pasceri V., Willerson J.T., Yeh E.T.: Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000;102(18): 2165-2168,
153. Thakore A.H., Guo C.Y., Larson M.G., Corey D., Wang T.J., Vasan R.S., D'Agostino R.B. Sr, Lipinska I., Keaney J.F. Jr, Benjamin E.J., O'Donnell C.J.: Association of multiple inflammatory markers with carotid intimal medial thickness and stenosis (from the Framingham Heart Study). *Am. J. Cardiol*. 2007; 99(11): 1598-1602,
154. Yu R.H., Ho S.C., Lam C.W., Woo J.L., Ho S.S.: Distribution of C-reactive protein and its association with subclinical atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal Chinese women. *Metabolism*. 2010; 59(11): 1672-1679,
155. Brändström H., Stiger F., Lind L., Kahan T., Melhus H., Kindmark A.: A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the human gene for osteoprotegerin is related to vascular morphology and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002; 293(1): 13-17,
156. 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(18): 2175-2180,
157. Akinci B., Demir T., Celtik A., Baris M., Yener S., Ozcan M.A., Yuksel F., Secil M., Yesil S.: Serum osteoprotegerin is associated with carotid intima media thickness in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract*. 2008; 82(2): 172-178,
158. Siepi D., Marchesi S., Vaudo G., Lupattelli G., Bagaglia F., Pirro M., Brozzetti M., Roscini A.R., Mannarino E.: Preclinical vascular damage in white postmenopausal women: the relevance of osteoprotegerin. *Metabolism*. 2008; 57(3): 321-325,
159. Kurnatowska I., Grzelak P., Kaczmarska M., Stefańczyk L., Nowicki M.: Serum osteoprotegerin is a predictor of progression of atherosclerosis and coronary calcification in hemodialysis patients. *Nephron. Clin. Pract*. 2011; 117(4): c297-304,
160. Vik A., Mathiesen E.B., Brox J., Wilsgaard T., Njølstad I., Jørgensen L., Hansen J.B.: Relation between serum osteoprotegerin and carotid intima media thickness in a general population - the Tromsø Study. *J. Thromb. Haemost*. 2010; 8(10): 2133-2139,
161. Ross R.: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med*. 1999, 340 (2), 115-126,

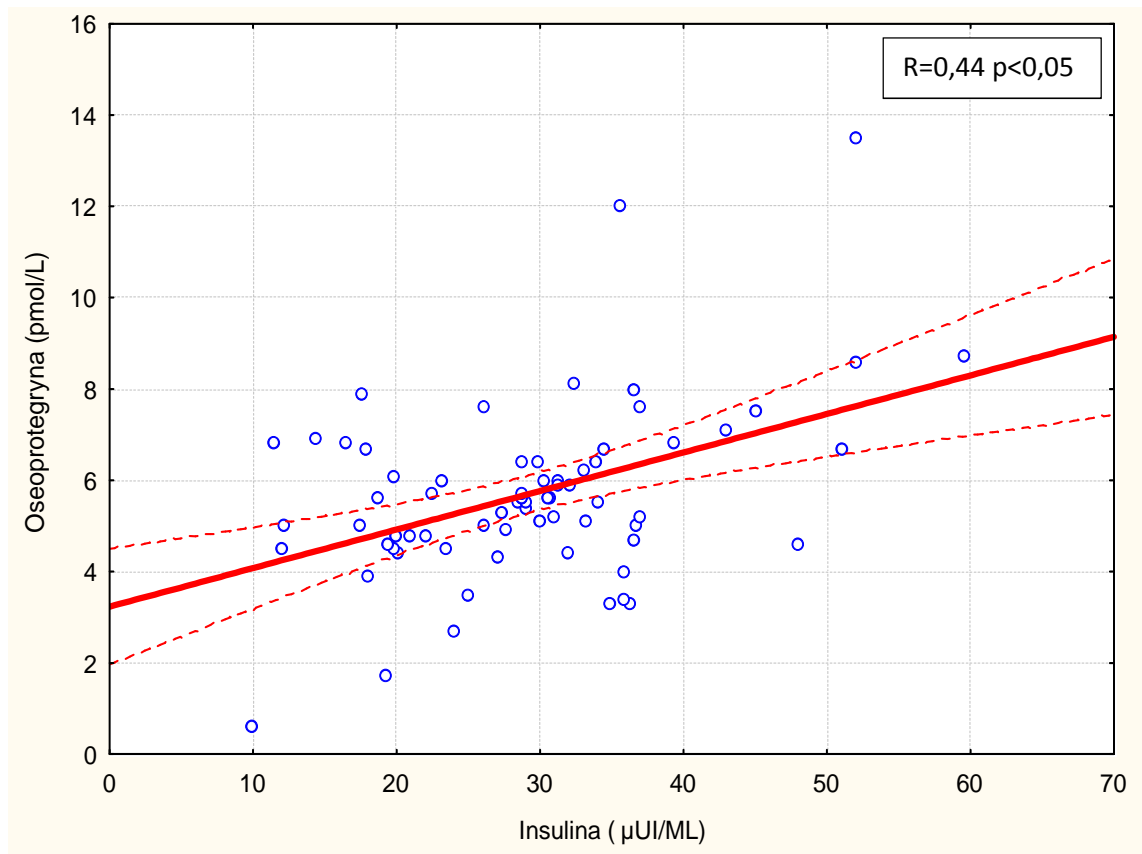
162. Undas A., Szczeklik A.: Miażdżycyca, Kardiologia pod red. A. Szczeklika i M. Tendery tom I. Medycyna Praktyczna, Kraków 2009: 321-328,
163. Doherty T.M., Asotra K., Fitzpatrick L.A., Qiao J.H., Wilkin D.J., Detrano R.C., Dunstan C.R., Shah P.K., Rajavashisth T.B.: Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100(20): 11201-11206,
164. Schinke T., Karsenty G.: Vascular calcification--a passive process in need of inhibitors. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000;15(9):1272-1274,
165. Dhore CR, Cleutjens J.P., Lutgens E., Cleutjens K.B., Geusens P.P., Kitslaar P.J., Tordoir J.H., Spronk H.M., Vermeer C., Daemen M.J.: Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21(12):1998-2003,
166. Olesen P., Ledet T., Rasmussen L.M.: Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF-alpha. *Diabetologia.* 2005; 48(3): 561-568,
167. Collin-Osdoby P.: Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ. Res.* 2004; 95(11): 1046-1057,
168. Schoppet M., Al-Fakhri N., Franke F.E., Katz N., Barth P.J., Maisch B., Preissner K.T., Hofbauer L.C.: Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(8): 4104-4112,
169. Dhore C.R., Cleutjens J.P., Lutgens E., Cleutjens K.B., Geusens P.P., Kitslaar P.J., Tordoir J.H., Spronk H.M., Vermeer C., Daemen M.J.: Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21(12): 1998-2003,
170. Sandberg W.J., Yndestad A., Øie E., Smith C., Ueland T., Ovchinnikova O., Robertson A.K., Müller F., Semb A.G., Scholz H., Andreassen A.K., Gullestad L., Damås J.K., Frøland S.S., Hansson G.K., Halvorsen B., Aukrust P.: Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26(4): 857-863,
171. Ziółkowska M., Kurowska M., Radzikowska A., Luszczkiewicz G., Wiland P., Dziewczopolski W., Filipowicz-Sosnowska A., Pazdur J., Szechinski J., Kowalczewski J., Rell-Bakalarska M., Maslinski W.: High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(7): 1744-1753,

172. Ben-Tal Cohen E., Hohensinner P.J., Kaun C., Maurer G., Huber K., Wojta J.: Statins decrease TNF-alpha-induced osteoprotegerin production by endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 2007; 73(1): 77-83,
173. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994; 344(8934): 1383-1389,
174. Pearson T., Mensah G., Alexander R., Anderson J., Cannon R., Criqui M., i
wsp.: Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003, 107 (3), 499-511.

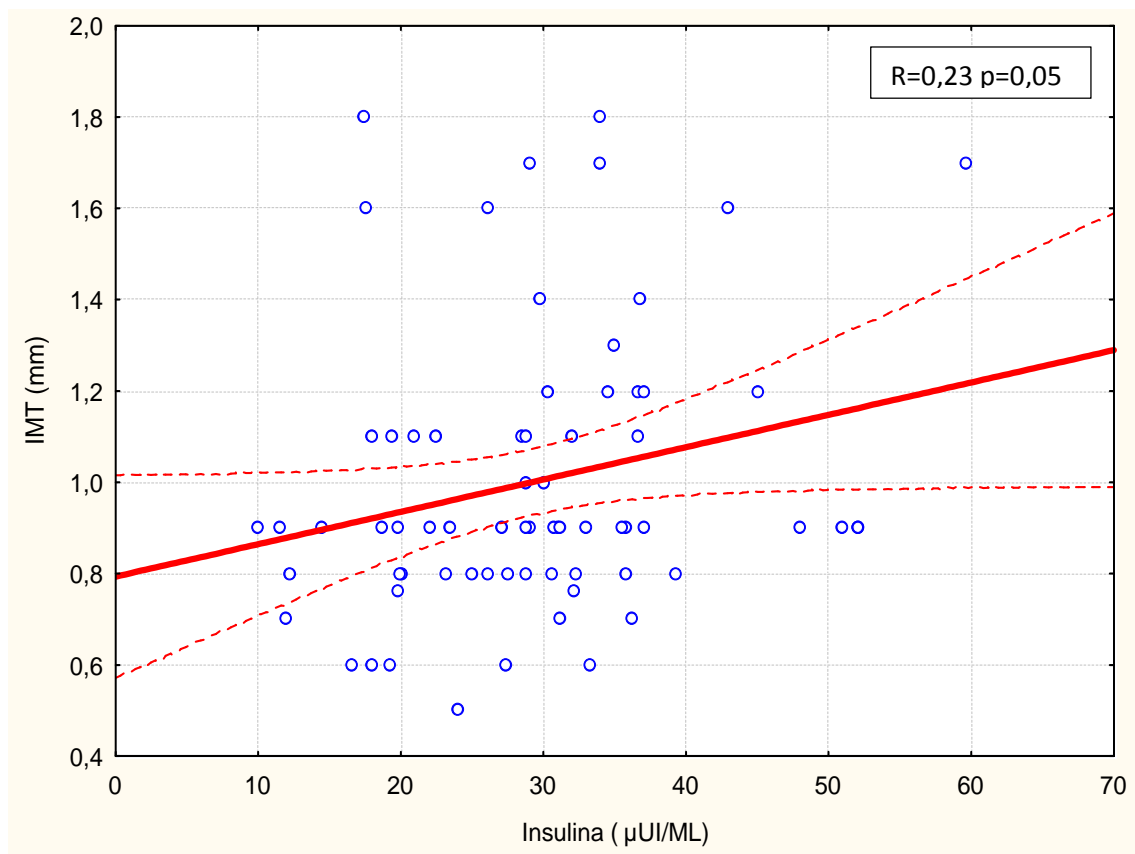
11. Aneks



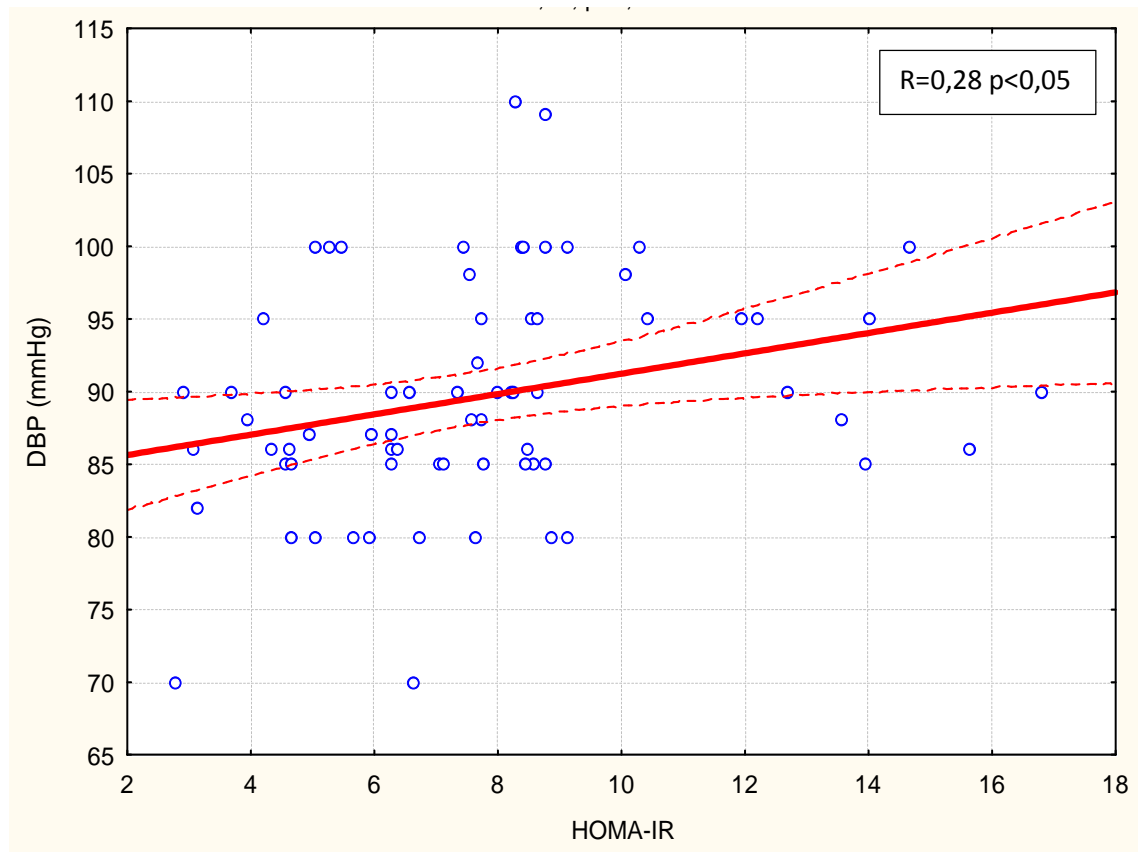
Rycina 1. Dodatnia korelacja pomiędzy masą ciała (mc) a stężeniem insuliny u pacjentów z zespołem metabolicznym.



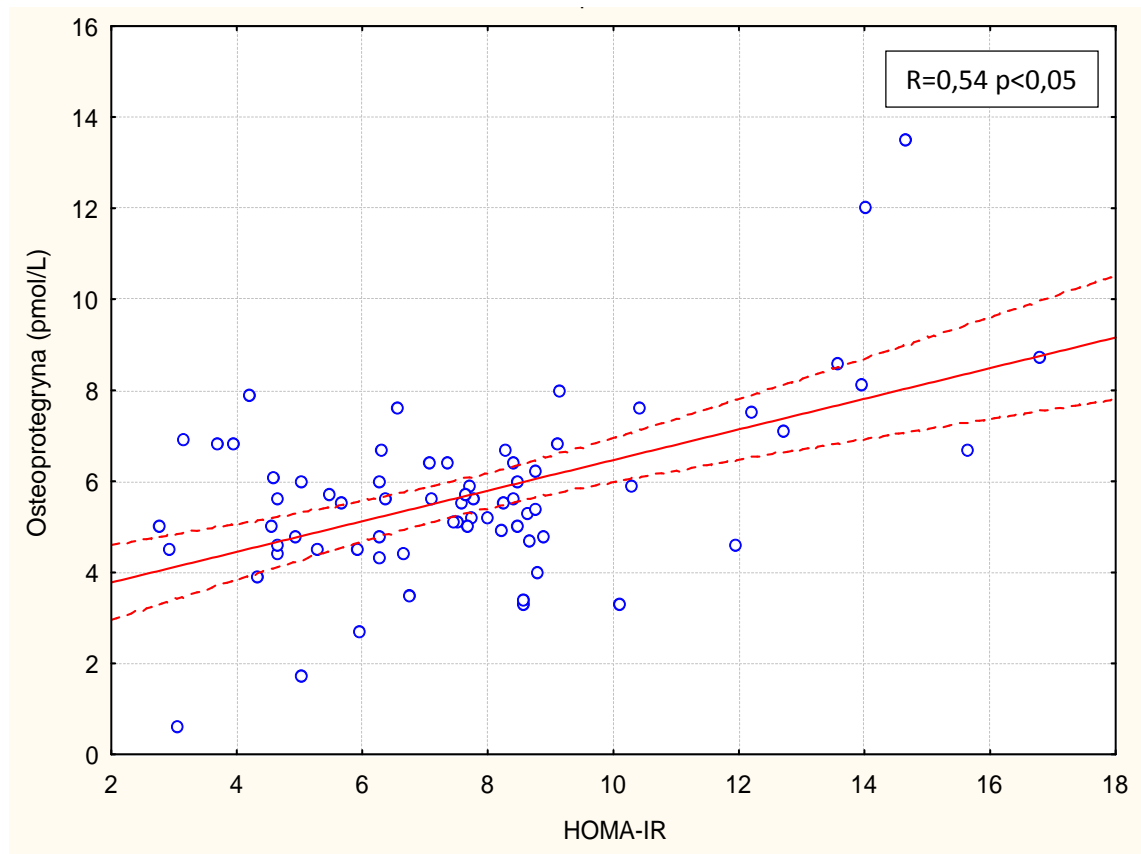
Rycina 2. Dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem insuliny a stężeniem osteoprotegeryny u pacjentów z zespołem metabolicznym.



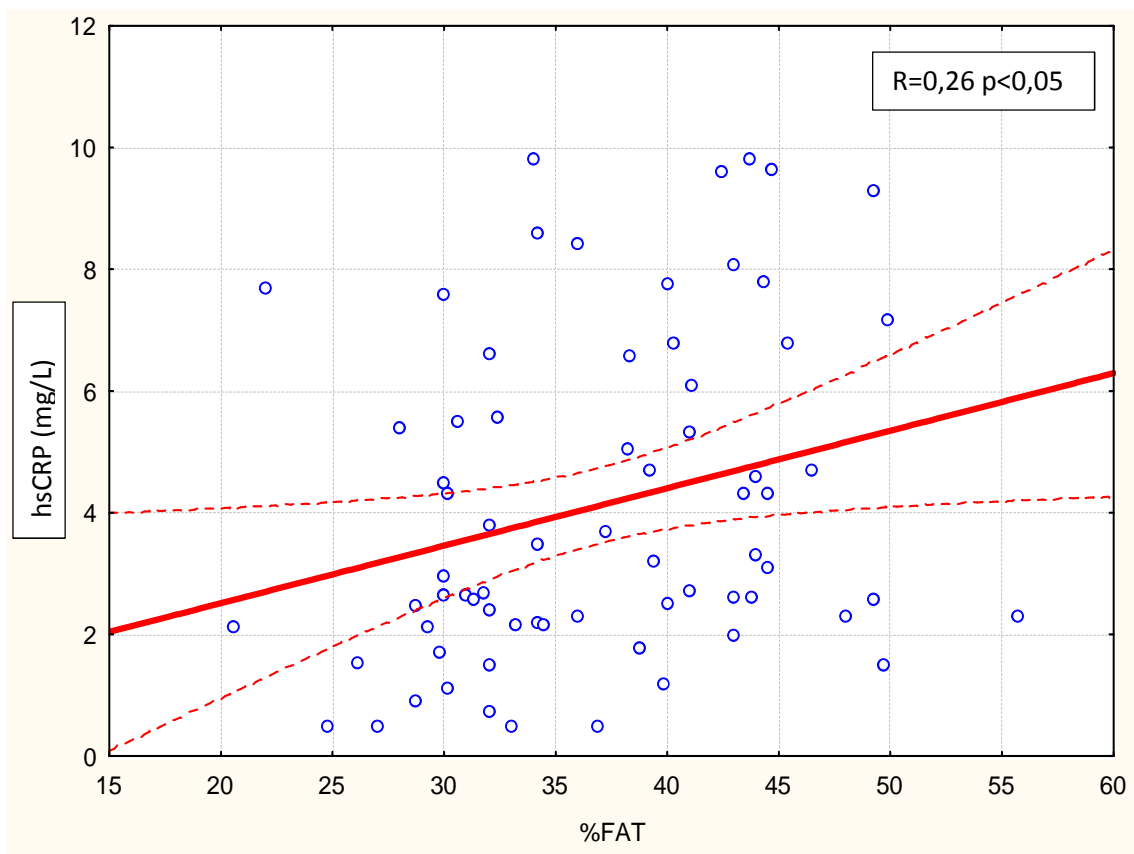
Rycina 3. Dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem insuliny a grubością kompleksu IM (IMT) u pacjentów z zespołem metabolicznym.



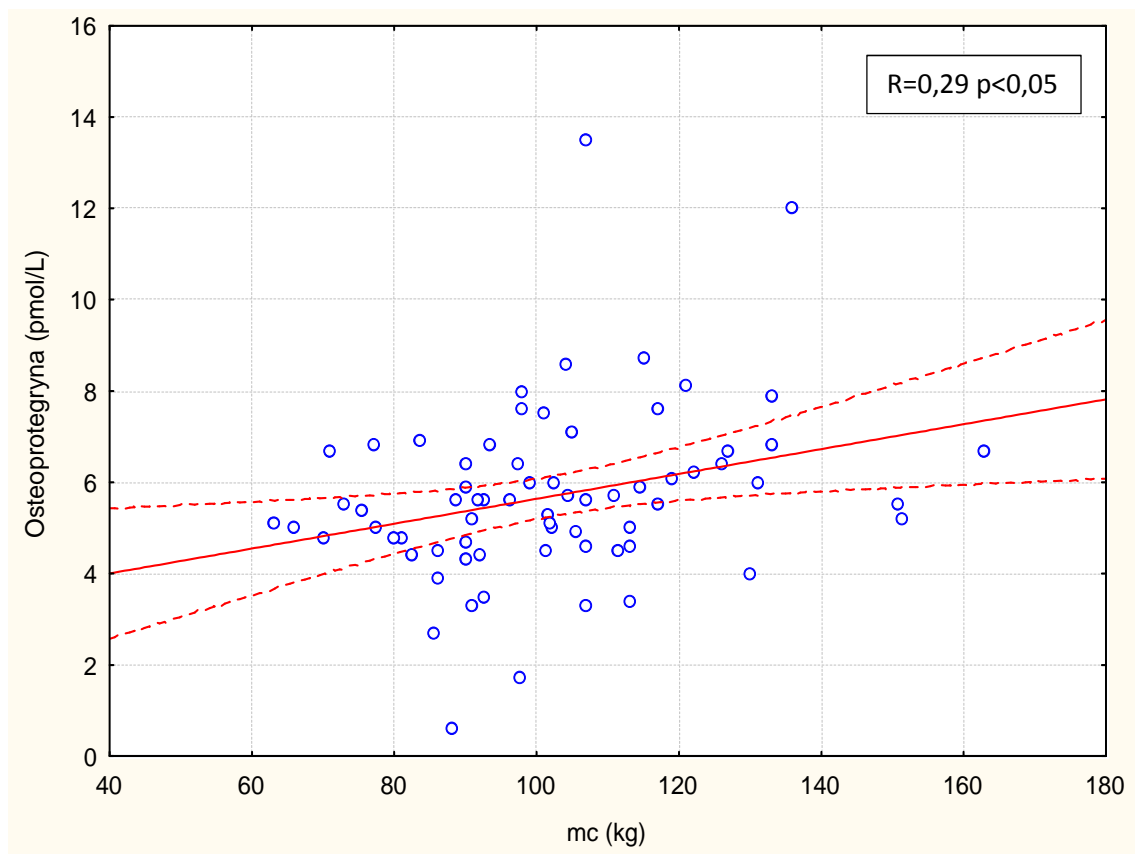
Rycina 4. Dodatnia korelacja pomiędzy wskaźnikiem insulinooporności HOMA (HOMA-IR) a rozkurczowym ciśnieniem tętniczym (DBP) u pacjentów z zespołem metabolicznym.



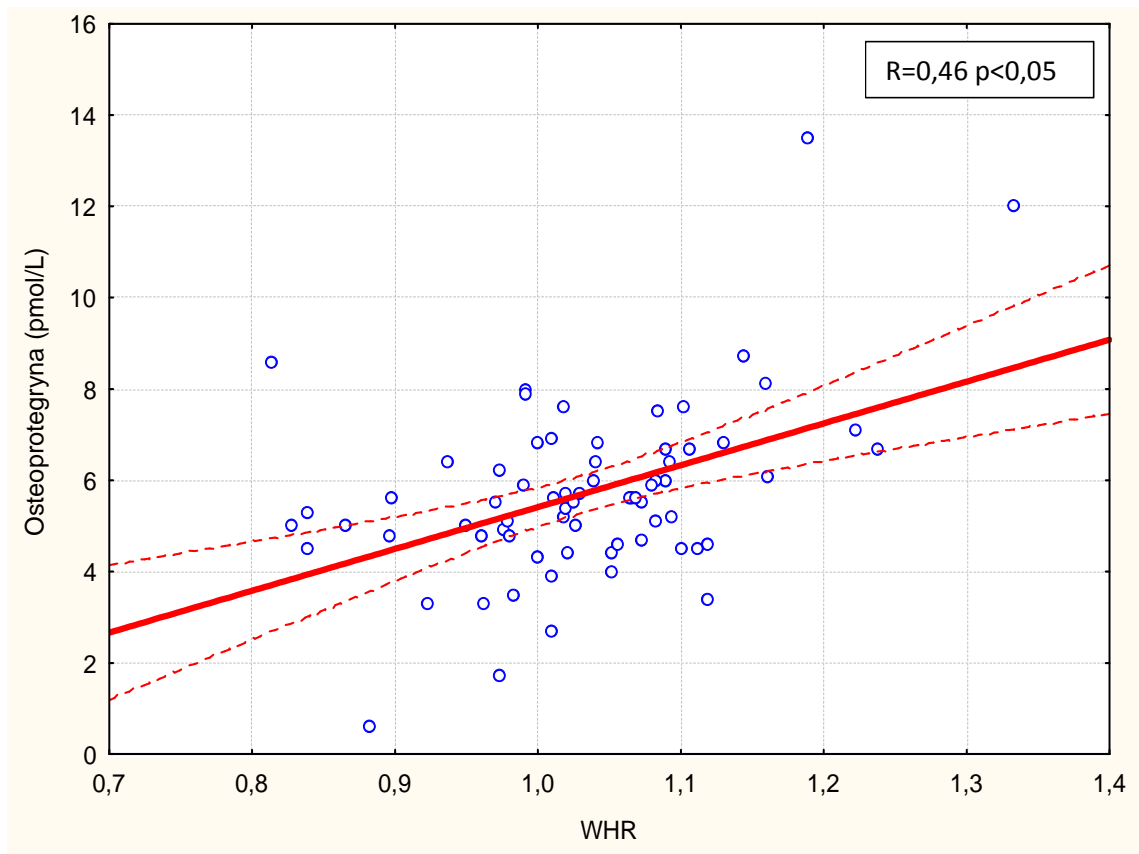
Rycina 5. Dodatnia korelacja pomiędzy wskaźnikiem insulinooporności HOMA (HOMA-IR) a stężeniem osteoprotegeryny u pacjentów z zespołem metabolicznym.



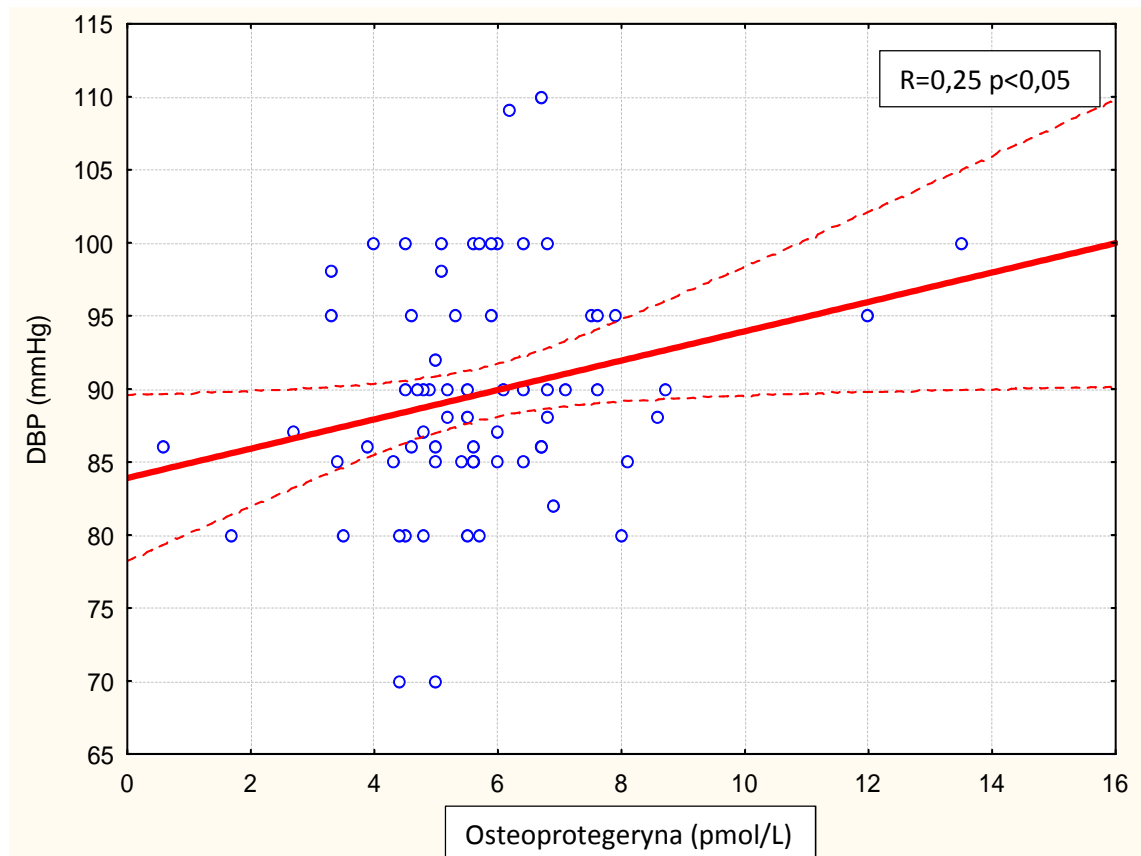
Rycina 6. Dodatnia korelacja pomiędzy względną zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie (%FAT) a stężeniem wysokoczułego białka C-reaktywnego (hsCRP) u pacjentów z zespołem metabolicznym.



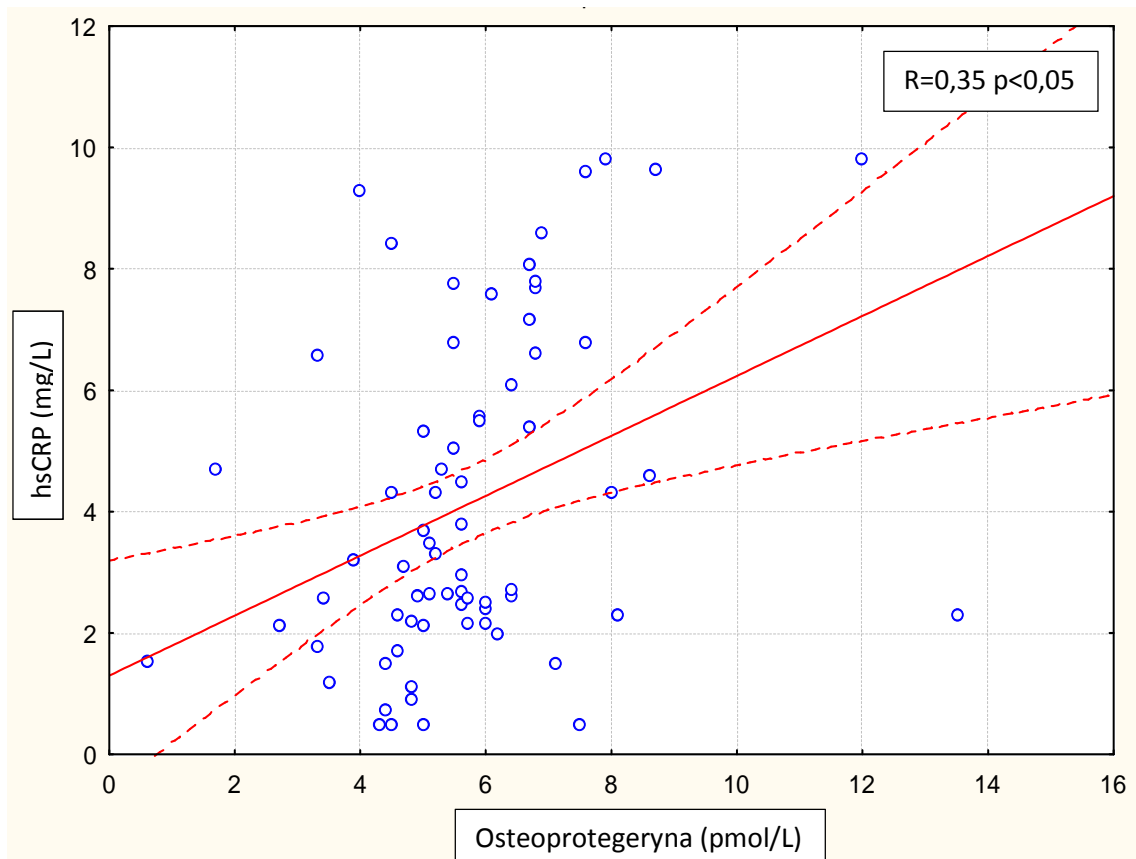
Rycina 7. Dodatnia korelacja pomiędzy masą ciała (mc) a stężeniem osteoprotegeryny u pacjentów z zespołem metabolicznym.



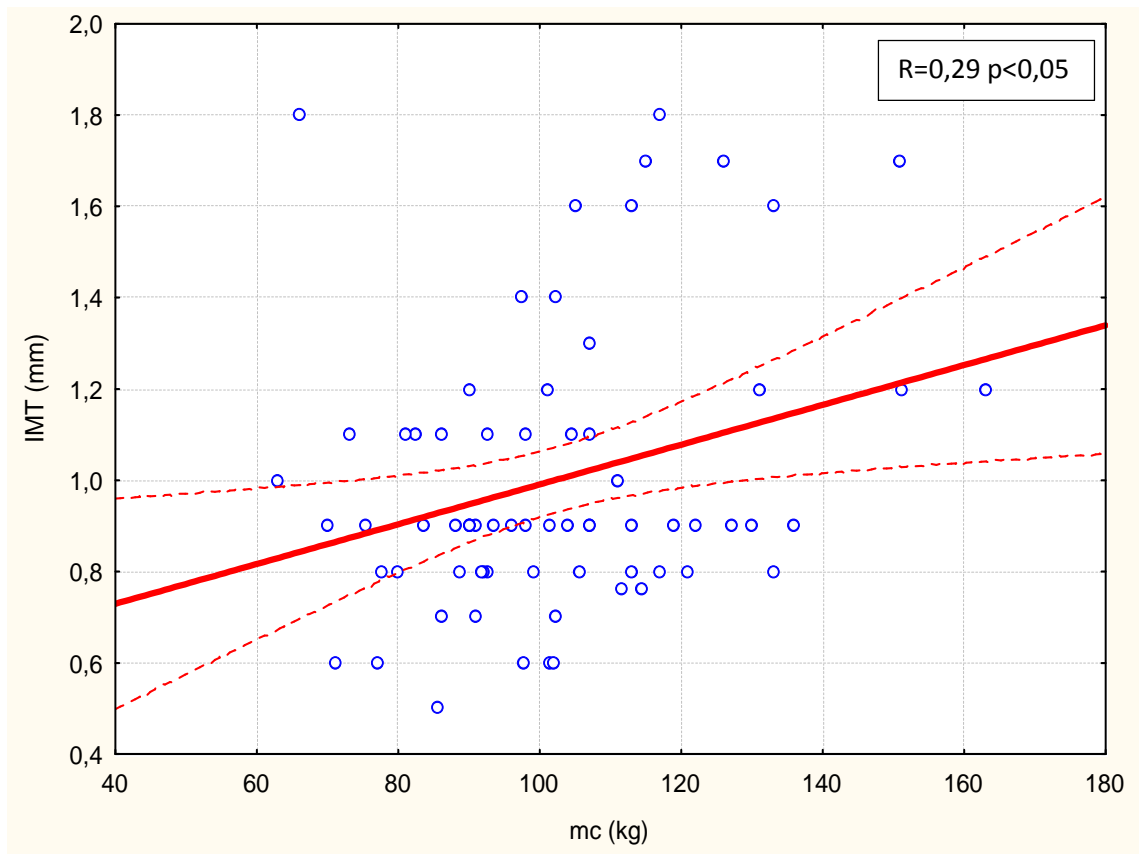
Rycina 8. Dodatnia korelacja pomiędzy wskaźnikiem talia-biodro (WHR) a stężeniem osteoprotegeryny u pacjentów z zespołem metabolicznym.



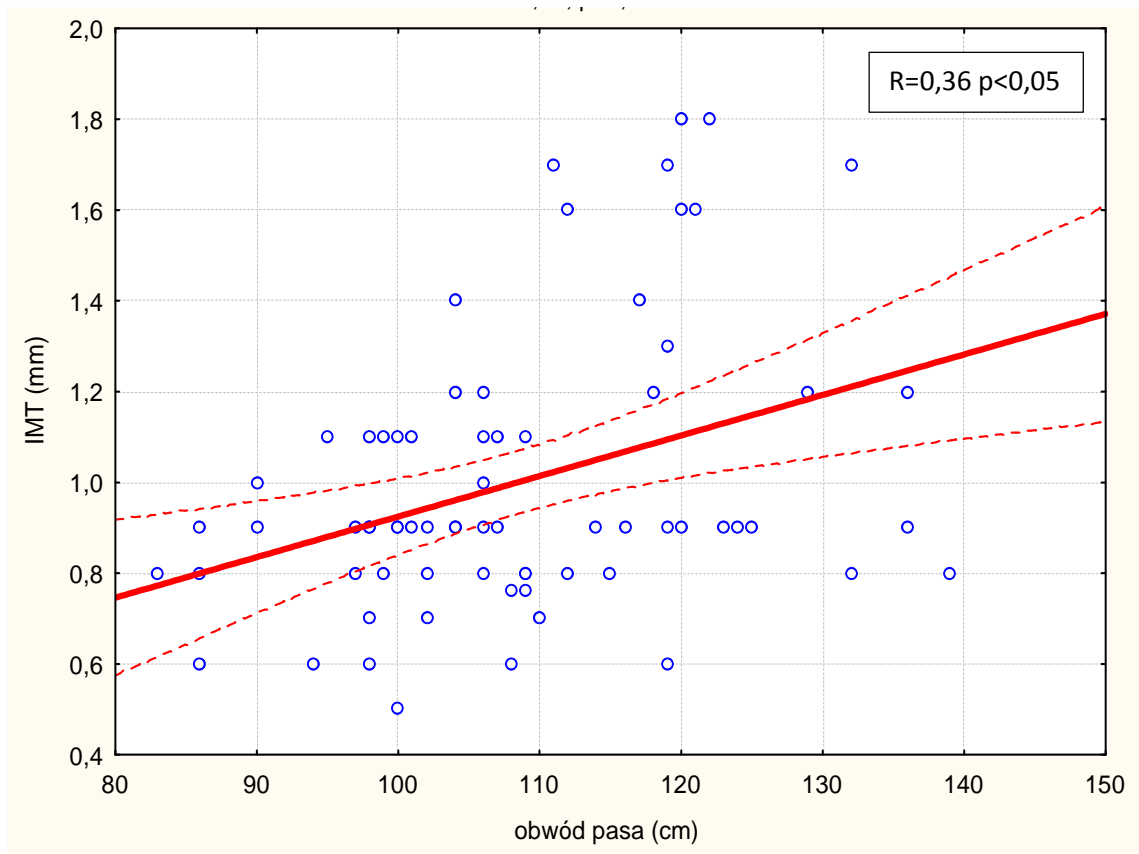
Rycina 9. Dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem osteoprotegeryny a rozkurczowym ciśnieniem tętniczym (DBP) u pacjentów z zespołem metabolicznym.



Rycina 10. Dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem osteoprotegeryny a stężeniem wysokoczułego białka C-reaktywnego (hsCRP) u pacjentów z zespołem metabolicznym.



Rycina 11. Dodatnia korelacja pomiędzy masą ciała (mc) a grubością kompleksu IM (IMT) u pacjentów z zespołem metabolicznym.



Rycina 12. Dodatnia korelacja pomiędzy obwodem pasa a grubością kompleksu IM (IMT) u pacjentów z zespołem metabolicznym.