



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di ricerca in “Medicina Clinica e Scienze del Comportamento”

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (DIBIMIS)

MED09

STUDIO DELLE INTERAZIONI E DELLE INFLUENZE DI OSTEOPROTEGERINA ED OSTEOPONTINA SULLE ALTERAZIONI VASCOLARI NELL'IPERTENSIONE ARTERIOSA ESSENZIALE

**IL DOTTORE
LAURA GUARINO**

**IL COORDINATORE
CH.MO PROF. ANTONIO PINTO**

**IL TUTOR
CH.MO PROF. GIUSEPPE MULÈ**

INDICE

Introduzione	2
Osteopontina	6
Osteoprotegerina	9
Osteopontina e rischio cardiovascolare	12
Osteoprotegerina e rischio cardiovascolare	16
Scopo dello studio	21
Materiali e metodi	22
Risultati	25
Discussione	26
Figure e tabelle	30
Bibliografia	38

INTRODUZIONE

L'osteopontina (OPN) e l'osteoprotegerina (OPG) sono noti inibitori della calcificazione vascolare, che sembrerebbero essere correlati all'infiammazione e all'aumentata incidenza di eventi cardiovascolari.

La calcificazione vascolare consiste di precipitati di sale di calcio, per lo più in forma di apatite, simile all'idrossiapatite presente nell'osso. La calcificazione vascolare e la mineralizzazione ossea, infatti, condividono una serie di interessanti caratteristiche anatomiche e fisiopatologiche comuni. La calcificazione del tessuto arterioso non è solo un processo passivo di precipitazione o assorbimento di fosfato e calcio ma è un processo altamente organizzato e regolato da meccanismi simili a quelli coinvolti nella mineralizzazione ossea [1-4].

Indubbiamente, la precipitazione di sali di calcio nella parete del vaso e gli eventi biologici a livello cellulare che portano all'ossificazione dei vasi rappresentano passi importanti nel danno vascolare indotto da varie patologie, tra cui il diabete, l'ipercolesterolemia e la malattia renale cronica. Tuttavia, nonostante la sua rilevanza clinica, la ricerca sul meccanismo di deposizione minerale nelle arterie è stata limitata.

I patologi nel 19° secolo hanno riconosciuto la presenza di tessuto osseo all'interno delle arterie aterosclerotiche [5]. Ciò nonostante, per la maggior parte del XX secolo, la calcificazione vascolare è stata considerata un processo passivo e degenerativo a carico delle placche aterosclerotiche avanzate. Il concetto di "ossificazione regolata" è emerso solo nell'ultimo ventennio [6-7].

Le prime prove della regolazione di tale processo provengono da Anderson, il quale ha riscontrato la presenza di vescicole di matrice (strutture coinvolte nell'osteogenesi) in aorte calcificate umane [8].

Giachelli et al, inoltre, hanno identificato l'espressione di una proteina della matrice ossea in una speciale popolazione di cellule muscolari lisce vasali (VSMC). Successivamente è stata rilevata l'espressione di fattori osteogenici, come la proteina morfogenetica ossea (BMP), l'OPN e proteina GLA della matrice (MGP) nelle cellule vascolari coltivate [9].

È stato dimostrato come la calcificazione cardiovascolare riproduca i processi inerenti la formazione di osso ortotopico [10]. I meccanismi principali proposti rientrano ampiamente in 2 categorie: induzione dell'osteogenesi e perdita di inibitori della mineralizzazione.

Una delle principali ipotesi è che la calcificazione vascolare sia una conseguenza della formazione ossea in situ da parte delle cellule di tipo osteoblastico [11-12]. Esistono diverse ipotesi sull'origine di queste cellule; alcuni studi indicano che la presenza di cellule osteoblastiche nella parete vascolare sia il risultato finale del cambiamento fenotipico delle VSMC, sebbene altre osservazioni puntino sull'attivazione e la differenziazione dei periciti residenti o delle cellule staminali circolanti (Figura 1).

La capacità di andare incontro a differenziazione reversibile è caratteristica del fenotipo VSMC; queste cellule si trovano in condizioni basali nella loro forma differenziata contrattile, ma sono in grado di rispondere a vari stimoli entrando in uno stato proliferativo sintetico al fine di produrre matrice extracellulare (ECM) [13]. Numerosi stimoli inducono le VSMC a subire una differenziazione osteogenica, tra cui lo stress ossidativo,

l'infiammazione, le BMP o le variazioni dei livelli di pirofosfato. Demer et al. hanno stabilito l'esistenza di una sottopopolazione di cellule muscolari lisce della parete vascolare, chiamate "cellule vascolari calcificanti" (CVC), che formano spontaneamente noduli e calcificano se mantenute in coltura a lungo termine. Questi noduli condividono molte proprietà con l'osso, inclusa l'aumentata attività della fosfatasi alcalina e l'espressione di osteocalcina, osteonectina e OPN [14]. Queste cellule hanno anche il potenziale per molteplici linee mesenchimali, compresi gli osteoblasti, e rappresentano (secondo alcune stime) dal 20% al 30% della popolazione totale di VSMC [12, 15-16].

Altre prove suggeriscono che l'attivazione dei periciti residenti nella parete del vaso possa contribuire alla calcificazione vascolare. Essi sono intimamente associati all'endotelio nella microvascolarizzazione; la loro migrazione rappresenta un passo cruciale nelle fasi successive dell'angiogenesi [17-19]. Inoltre sono in grado di differenziarsi in osteoblasti e condrociti [20-21]. Come le CVC, producono grandi noduli sia di cellule che di ECM quando sono in coltura a lungo termine; questi noduli contengono collagene di tipo I, OPN, MGP e osteocalcina. L'attivazione di questo tipo di cellule nella lesione aterosclerotica può quindi fornire una fonte di osteoprogenitori nella parete dell'arteria [12, 22-24].

Una serie di evidenze mostrano come la neoangiogenesi sia un requisito necessario per la calcificazione vascolare e valvolare. Il meccanismo che spiega la colocalizzazione dell'angiogenesi e della calcificazione è probabilmente multifattoriale e alla base di esso vi è l'interazione coordinata di VSMC, periciti, osteoprogenitori residenti e circolanti,

nonché di cellule osteoblastiche. Come osservato da Collett e Canfield, citochine, quali BMP-2 e -4, così come il fattore di crescita endoteliale VEGF (vascular endothelial growth factor) stimolano la migrazione e la differenziazione degli osteoblasti. In particolare, i recettori del VEGF sono stati evidenziati su questi tipi di cellule così come sui condrociti. In questo modo, esso modula la funzione e il fenotipo di tali cellule e stimola l'attività dei condrociti [25]. Altri mediatori dell'angiogenesi, compresa la sialoproteina ossea e l'OPN, hanno dimostrato di essere presenti nelle placche fibrocalcifiche [26].

L'altro meccanismo predominante con cui avviene la calcificazione vascolare è la perdita di inibitori fisiologici di tale processo, tra cui il pirofosfato inorganico, la MGP, l'OPN, l'OPG e la fetuina-A.

OSTEOPONTINA

L'osteopontina è una glicoproteina acida fosforilata, originariamente identificata come una proteina della matrice ossea, poi riconosciuta come una citochina secreta nei fluidi corporei [27]. Le fosfoserine dell'OPN sono amminoacidi carichi negativamente che hanno una forte affinità per l'idrossiapatite. È normalmente presente nei tessuti mineralizzati come ossa e denti, ma può essere espressa da molti tipi di cellule differenti (compresi fibroblasti, cellule epiteliali, cellule endoteliali, VSMC e cellule ematopoietiche). I monociti esprimono basse quantità di OPN; tuttavia, la differenziazione da monociti a macrofagi è associata ad un marcato aumento della sintesi di OPN [28]. L'OPN è anche fortemente espresso dalle cellule dendritiche immature [29]. Angiotensina II, citochine proinfiammatorie e fattori di crescita sono in grado di stimolare l'espressione di OPN nei fibroblasti e nelle VSMC. Nello specifico, l'angiotensina II è un potente induttore dell'OPN nelle cellule muscolari lisce [30] e nei fibroblasti [31]; IL-1 β induce l'OPN nei fibroblasti polmonari [32] e migliora la sintesi di OPN nei fibroblasti cardiaci stimolati con angiotensina II [31]; PDGF-BB, PDGF-AB, FGF-1, FGF-2 e TGF- β potenziano l'espressione di OPN nelle VSMC [30,33-35].

L'espressione costitutiva di OPN nei macrofagi e la sua sintesi inducibile da un'ampia varietà di mediatori in molti tipi di cellule determina una sua marcata sovraespressione nei tessuti lesi. Infatti è stata osservata una maggiore espressione di OPN nei processi infiammatori, angiogenici e fibrotici, nelle ferite in via di guarigione, nelle lesioni calcificate, nell'aterosclerosi e nelle neoplasie [35].

L'OPN è una proteina multifunzionale che modula l'adesione cellulare, la

sopravvivenza e l'espressione genica. Essa agisce come una citochina, quando secreta in forma solubile, e come una proteina matricellulare quando viene immobilizzata nella matrice. Sembrerebbe, inoltre, fungere da segnale di sopravvivenza; i suoi effetti protettivi sono, almeno in parte, mediati dall'inibizione dell'apoptosi [35]. Sia la forma solubile che l'OPN legato alla matrice sono in grado di trasdurre i segnali anti-apoptotici [36]. Ciò può essere importante nella patogenesi della neoplasia. L'espressione di OPN, infatti, è aumentata in molti tumori, potendo prevenire la morte apoptotica delle cellule maligne [37].

Molti tipi di cellule aderiscono all'OPN mediante interazioni che coinvolgono le integrine o la proteina CD44. In vitro, l'OPN è un chemioattrattante per una varietà di cellule, inclusi monociti, cellule T, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e cellule epiteliali. Le cellule maligne sono spesso più reattive agli effetti dell'OPN rispetto alle cellule normali; probabilmente per l'espressione aberrante di integrine da parte delle cellule neoplastiche [38].

Numerose prove dimostrano come l'OPN attivi i macrofagi, indicando come queste cellule siano sia una fonte importante che un bersaglio dell'OPN. Inoltre, l'OPN induce la sintesi di IL-12 da parte dei macrofagi, sopprimendo l'espressione di IL-10 e contribuendo allo sviluppo di una risposta Th1 [39]. Sono stati riportati anche effetti di OPN sulla sopravvivenza, proliferazione e differenziazione dei linfociti T. Queste azioni sono importanti nel mediare le funzioni in vivo dell'OPN [40], tra cui effetti critici nelle risposte immunitarie e infiammatorie, azioni modulatorie nel rimodellamento osseo e importanti effetti nella regolazione della riparazione delle ferite, della fibrosi e dell'angiogenesi. L'OPN

modula, quindi, l'immunità cellulo-mediata promuovendo i Th1 e inibendo la risposta Th2 [41]. Per cui la perdita di OPN provoca una compromissione dell'immunità cellulare contro virus e batteri [35,39].

Studi in vivo hanno anche suggerito un ruolo importante dell'OPN nella fibrosi tissutale. Nei topi distrofici, infatti, la perdita di OPN provoca un'attenuata fibrosi del muscolo scheletrico, probabilmente per una ridotta espressione di TGF- β [42]. Topi OPN null hanno anche mostrato una ridotta deposizione di matrice in un modello di fibrosi renale [43].

Sebbene l'OPN non svolga un ruolo nello sviluppo osseo normale, in condizioni patologiche modula il turnover osseo inibendo la mineralizzazione, promuovendo la differenziazione e incrementando l'attività degli osteoclasti.

L'OPN è altamente sovraespresso nelle lesioni aterosclerotiche, prevalentemente nei macrofagi, nelle cellule muscolari lisce e nelle cellule endoteliali angiogeniche. Alcuni studi mostrano come l'OPN sia, infatti, un importante mediatore nella patogenesi della formazione della placca e un regolatore del processo di calcificazione vascolare [30]. L'OPN regola la mineralizzazione in due modi diversi. Da un lato inibisce la crescita dei cristalli di apatite, dall'altro promuove la funzione degli osteoclasti. Nell'arterie normali l'OPN è assente, mentre nelle placche calcificate è abbondantemente presente. La ricerca suggerisce come l'OPN sia importante per regolare la calcificazione quando l'arteria è lesionata [44].

OSTEOPROTEGERINA

L'OPG, chiamata "protettore dell'osso", citochina della superfamiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNF), è una glicoproteina solubile di 380 amminoacidi prodotta dagli osteoblasti, che inibisce l'attivazione degli osteoclasti e promuove l'apoptosi degli osteoclasti in vitro.

Agisce come recettore "esca" per RANKL (RANK-Ligando) e quindi inibisce l'osteoclastogenesi e l'attivazione dell'osteoclasto impedendo il legame di RANKL a RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) [45-46] e bloccando, di conseguenza, l'attivazione del RANK [47] (Figura 2).

In particolare, il RANK-L, proteina espressa sugli osteoblasti, si lega al RANK, presente sugli osteoclasti e su tutte le cellule della linea monocitaria, portando alla trasduzione di un segnale diretto al NF- κ B (fattore nucleare di trascrizione che regola la produzione di molte citochine pro-infiammatorie) che, a sua volta, induce alla differenziazione, allo sviluppo e all'attivazione degli osteoclasti. Per interrompere questo circuito è necessario bloccare l'interazione tra RANKL e RANK tramite l'OPG, la quale è prodotta dagli stessi osteoblasti.

L'OPG protegge, quindi, lo scheletro da un eccessivo riassorbimento osseo. Pertanto, il rapporto RANKL/OPG è un importante fattore determinante la massa ossea e l'integrità scheletrica [48].

L'OPG si lega ad un altro membro della superfamiglia del TNF, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Esso funziona come un omotrimerico ed è espresso come una proteina transmembrana di tipo II [49]. Il dominio extracellulare di questa proteina può essere scisso proteoliticamente dalla superficie cellulare per agire come una citochina solubile. TRAIL agisce legandosi a quattro recettori. Due di questi recettori (TRAIL receptor 1/death receptor 4 and TRAIL receptor 2/death receptor

5) sono in grado di mediare l'apoptosi attraverso le vie di attivazione della caspasi. Bloccando TRAIL, OPG impedisce l'apoptosi delle cellule tumorali. Infatti TRAIL induce l'apoptosi in cellule trasformate come cellule maligne, viralmente infette e sovraattivate, mentre risparmia quelle normali [50].

Coerentemente con il concetto che TRAIL innesca segnali non-apoptotici nelle cellule normali, è stato dimostrato come la somministrazione di TRAIL riduca significativamente la fibrosi cardiaca e l'apoptosi in un modello murino di cardiomiopatia diabetica [51]. I potenziali meccanismi alla base della capacità di TRAIL di attivare tali percorsi opposti includono la redistribuzione dei recettori TRAIL [52-53] e l'inibizione intracellulare della cascata apoptotica [54].

Oltre che dagli osteoblasti, è prodotta da molti tessuti del corpo, compreso il sistema cardiovascolare. L'espressione di OPG è particolarmente elevata nelle VSMC e nelle cellule endoteliali dell'aorta e delle arterie renali. Le molecole che stimolano la sintesi di OPG sono: IL-1 α , IL-6, IL-11, IL-17, IL-18, TNF- α , TNF- β , BMP-2, calcio, vitamina D3, estrogeni, angiotensina II e fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF). Invece PTH, glucocorticoidi, prostaglandina E2, farmaci immunosoppressori, recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR- γ) e il fattore di crescita fibroblastico basale (bFGF) inibiscono la produzione di OPG [55].

Un equilibrio costante tra RANKL e OPG previene i disordini del rimodellamento osseo e la calcificazione vascolare. I topi con deficit di OPG (OPG $-/-$) sviluppano calcificazioni dell'aorta e delle arterie renali, oltre che osteoporosi [56]. Tuttavia, risultati opposti sono stati osservati negli studi clinici. Nei pazienti in dialisi, a esempio è stata evidenziata un'associazione indipendente tra i livelli sierici di OPG e le calcificazioni vascolari [57] ed è stato dimostrato come i livelli di OPG possano, in parte,

spiegare l'associazione tra le calcificazioni coronariche e la CKD (chronic kidney disease) [58].

Nelle cellule endoteliali l'OPG è associato al fattore di von Willebrand (vWF), la glicoproteina coinvolta nell'emostasi primaria, anche marker di danno endoteliale. In risposta a stimoli infiammatori, OPG e vWF vengono rapidamente secreti; ciò può dimostrare il ruolo dell'OPG nel danno vascolare, nell'infiammazione e nell'emostasi. Poiché OPG è in grado di legare la trombospondina-1, reduttasi del vWF, può anche svolgere un ruolo nella regolazione della formazione di trombi [59].

L'OPG è inoltre coinvolto nella risposta anticorpale efficiente e nella maturazione delle cellule B [60].

OSTEOPONTINA E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

In condizioni basali l'espressione di OPN nel cuore e nei vasi normalmente è bassa [61]. Tuttavia, essa aumenta marcatamente nel cuore in diversi stati patologici [62-68]. È stato dimostrato, ad esempio, come l'incrementata espressione di OPN sia associata allo sviluppo di insufficienza cardiaca [65]

Nelle lesioni aterosclerotiche umane, l'OPN è espressa nelle cellule muscolari lisce, nelle cellule endoteliali angiogeniche e nei macrofagi [30,69].

Modelli animali hanno confermato il ruolo dell'OPN nel rimodellamento vascolare. In un modello murino di stenosi vascolare, l'OPN era espresso nelle cellule muscolari lisce intime che andavano incontro a proliferazione e migrazione e l'accumulo intinale di cellule muscolari lisce era inibito da anticorpi anti-OPN [70]. Più recentemente, Isoda e al. hanno dimostrato che l'iperespressione forzata di OPN induce l'ispessimento dello strato mediale e aumenta formazione di neointima dopo il danno vascolare. Questi risultati sono anche correlati con l'aumento della proliferazione e migrazione di cellule muscolari lisce e la produzione di metalloproteinasi della matrice [71]. Tutti questi dati indicano che durante la formazione della lesione, l'OPN modula la proliferazione, la migrazione e l'accumulo di cellule muscolari lisce e endoteliali coinvolte nei processi di riparazione e rimodellamento del sistema vascolare.

L'OPN sembra anche essere un importante regolatore della calcificazione vascolare ed è associato a depositi mineralizzati nell'uomo [30].

La calcificazione vascolare fornisce un importante contributo alla perdita di compliance arteriosa e all'aumento della pressione cardiaca osservata con l'età, il diabete e l'insufficienza renale. Pertanto, l'OPN, insieme ad altri

inibitori della biomineralizzazione, può regolare la calcificazione che si verifica in queste condizioni patologiche.

Un'aumentata espressione di OPN è stata costantemente riscontrata in modelli sperimentali di infarto del miocardio. Utilizzando un modello di crio-danno cardiaco nel ratto, Murry et al. hanno dimostrato una marcata sovraregolazione di OPN nel miocardio infartuato. La proteina OPN era localizzata in un sottogruppo di macrofagi che infiltravano la lesione. L'aumentata espressione di OPN raggiungeva il picco 1-2 giorni dopo l'infarto, ma tale incremento era transitorio; i livelli di OPN si riducevano marcatamente 1 settimana dopo. Ciò si verificava nonostante la presenza di abbondanti macrofagi, suggerendo che la sovraregolazione di OPN nel cuore infartuato non riflette semplicemente l'infiltrazione dei macrofagi, ma può essere dovuta all'attivazione o al reclutamento di sottogruppi di macrofagi differenti. È stata osservata anche una maggiore espressione di OPN in campioni di infarto miocardico umano [72].

Studi sperimentali hanno suggerito come l'OPN possa svolgere un ruolo importante nella riparazione e nel rimodellamento cardiaco postinfartuale. Rispetto agli animali wild type, i topi OPN null presentano un'accentuata dilatazione ventricolare sinistra dopo infarto miocardico. Ciò non è dovuto ad un aumento della perdita di cardiomiociti ma ad una ridotta deposizione di collagene [62]. Diversi meccanismi potrebbero essere implicati. L'OPN potrebbe regolare l'assemblaggio del collagene attraverso azioni dirette o modulando la sintesi dei proteoglicani coinvolti nella fibrillogenasi oppure potrebbe modulare l'espressione di fattori di crescita necessari per la deposizione di tessuto fibroso. L'OPN potrebbe, inoltre, favorire la deposizione della matrice aumentando l'attività dei macrofagi che si infiltrano nell'infarto o modulando il profilo e le proprietà funzionali delle sottopopolazioni linfocitarie [42] reclutate. Esperimenti in vitro hanno

dimostrato che l'OPN media gli effetti proliferativi dell'angiotensina II nei fibroblasti cardiaci [73]. Infine, gli effetti dell'OPN nella riparazione cardiaca potrebbero essere mediati dall'attivazione di vie angiogeniche.

Animali con inattivazione del CD44, un altro importante ligando dell'OPN, presentano difetti riparatori sovrapponibili agli animali OPN null. Nell'infarto presentano, infatti, un accentuato rimodellamento dilatativo, associato ad una ridotta deposizione di collagene [74].

La sintesi di OPN è marcatamente incrementata nei modelli sperimentali di ipertrofia e fibrosi cardiaca; la sua espressione è associata allo sviluppo di insufficienza cardiaca.

L'angiotensina II sembrerebbe svolgere un ruolo importante nel mediare l'iperpressione di OPN nel miocardio ipertrofico. L'inibizione dell'ACE (angiotensin converting enzyme) riduce l'espressione di OPN nel miocardio in ratti spontaneamente ipertesi [65]. Inoltre, l'infusione di angiotensina II induce un marcato aumento dell'espressione di OPN nel miocardio, associato a fibrosi e ipertrofia cardiomiocitica [75-76]. Due studi indipendenti hanno esaminato il ruolo dell'OPN nel mediare le azioni in vivo dell'angiotensina nel miocardio utilizzando un modello di infusione di angiotensina II, che induce una marcata ipertrofia cardiaca accompagnata da fibrosi interstiziale e perivascolare. Matsui et al. [76] hanno dimostrato come l'assenza di OPN attenui gli effetti ipertensivi e profibrotici dell'angiotensina II, senza avere effetti sull'ipertrofia dei cardiomiociti.

Indipendentemente, Collins et al. [75] hanno ottenuto risultati simili. La fibrogenesi indotta da OPN può essere dovuta ad una maggiore chemiotassi e attivazione dei macrofagi, ad effetti diretti sull'adesione e proliferazione dei fibroblasti o alla facilitazione della fibrillogenesi del collagene.

Numerose evidenze dimostrano come l'OPN sia marcatamente espresso nelle lesioni valvolari, suggerendo un suo ruolo nella regolazione della

calcificazione ectopica. Nelle lesioni aortiche umane, i livelli di espressione di OPN sono associati al grado di calcificazione [77-80].

Poco numerosi sono gli studi clinici volti ad esaminare il ruolo dell'OPN nell'incremento del rischio e degli eventi cardiovascolari.

Chen et al., comparando 210 soggetti con patologia coronarica e 134 individui senza coronaropatia, hanno dimostrato come l'OPN sia associata all'insufficienza renale e alla severità delle lesioni coronariche [81].

È stata osservata anche una correlazione positiva tra l'OPN e la presenza di calcificazioni coronariche nei pazienti emodializzati [82] e nei pazienti con diabete mellito tipo 2 (DMT2) [83-84]. In questi ultimi è stata pure riscontrata una correlazione positiva tra l'OPN e lo spessore intimo mediale carotideo (IMT) [84].

Nei diabetici di tipo 1, invece, l'OPN ha mostrato di essere un forte predittore di nefropatia diabetica incipiente e di mortalità per tutte le cause [85].

Nei soggetti geriatrici l'OPN sembrerebbe essere un indipendente predittore di elevati valori di PWV (pulse wave velocity) carotideo-femorale [86]. È stata inoltre osservata un'associazione tra l'OPN e l'ipertensione arteriosa [87]. Tuttavia, non esistono dati che mostrino l'eventuale esistenza di una relazione tra l'OPN e i marcatori di danno d'organo negli ipertesi essenziali.

OSTEOPROTEGERINA E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

L'OPG sembra essere il legame tra tessuto osseo e sistema vascolare [88].

In modelli animali, Bucay et al. [56] hanno dimostrato come topi OPG knockout sviluppino calcificazioni arteriose spontanee. Inoltre, nei topi ApoE knockout (un modello ben noto di aterosclerosi), la deplezione di OPG aumenta la progressione dell'aterosclerosi e della calcificazione. L'OPG sembrerebbe pertanto proteggere dalla calcificazione vascolare [89].

È stato dimostrato come l'inizio della calcificazione arteriosa nei topi con deficit di OPG possa essere prevenuto da OPG transgenico introdotto dalla metà della gestazione fino all'età adulta. Inoltre, è interessante notare come l'iniezione endovenosa postnatale di OPG ricombinante non abbia alcun effetto sulla presenza di calcificazione vascolare. Quindi l'OPG non può invertire il processo di calcificazione una volta avvenuto [90].

Sebbene la maggior parte degli studi condotti sugli animali sostenga un ruolo protettivo dell'OPG nel sistema vascolare, gli studi sull'uomo hanno paradossalmente dimostrato un'associazione positiva tra i livelli sierici di OPG e la malattia cardiovascolare clinica. Ciò sembra essere in contrasto con il suo ruolo protettivo sulla parete arteriosa. Ad esempio, alcuni studi clinici mostrano una correlazione tra livelli più elevati di OPG e calcificazione vascolare, aterosclerosi avanzata, malattia coronarica, infarto miocardico, insufficienza cardiaca, complicanze del diabete, aneurisma dell'aorta addominale, arteriopatia periferica, stenosi carotidea sintomatica e mortalità cardiovascolare [55-91]. In vivo l'OPG sierico sembrerebbe

essere, infatti, un fattore prognostico indipendente per malattia cardiovascolare [92].

Non è chiaro se l'aumento dell'OPG sia semplicemente un marker di danno vascolare, regoli attivamente la progressione della malattia o rappresenti un meccanismo volto a limitare la patologia vascolare [93]. L'OPG potrebbe agire come fattore protettivo per la malattia vascolare e il suo incremento potrebbe essere una risposta compensatoria alla progressione della calcificazione vascolare.

Esistono, tuttavia, prove del coinvolgimento dell'OPG nella patogenesi dell'aterosclerosi e delle malattie cardiovascolari, mediante l'amplificazione degli effetti avversi dell'infiammazione e di vari fattori di rischio come l'iperlipidemia, la disfunzione endoteliale, il diabete mellito e l'ipertensione [94-95].

Recentemente sono stati descritti tre polimorfismi del gene OPG (T245G, T950C e G1181C), correlati all'aumento sierico di questa glicoproteina, che si riscontra più frequentemente nei pazienti con placche aterosclerotiche carotidee [96] o nei soggetti diabetici con storia di stroke [97].

La prima associazione tra OPG e patologie cardiovascolari in vivo è stata pubblicata nel 2001 da Browner et al., [98] il quale ha riportato un'associazione tra elevati livelli plasmatici di OPG e un aumento della mortalità cardiovascolare in uno studio di coorte di 490 donne di età superiore a 65 anni.

In un altro studio di coorte basato su popolazione, livelli sierici aumentati di OPG sono stati associati al rischio futuro di infarto miocardico, ictus

ischemico e mortalità cardiovascolare [99].

Inoltre, è stato dimostrato come l'incremento delle concentrazioni sieriche di OPG in pazienti con infarto miocardico acuto sia correlato ad una ridotta microcircolazione dopo rivascolarizzazione [100].

In tre studi trasversali, condotti su pazienti coronaropatici sottoposti ad angiografia, livelli aumentati di OPG sono stati associati alla presenza e alla gravità dell'aterosclerosi coronarica [101-102].

Per di più, dati recenti del Dallas Heart Study mostrano un aumento della prevalenza della placca aortica e della calcificazione delle coronarie (CAC) al crescere dei quartili di OPG sierica. In questo studio, infatti, dopo correzione per i fattori di rischio tradizionali, il quartile superiore di OPG era indipendentemente associato alla prevalenza e all'estensione della CAC e della placca aortica [103].

In pazienti con artrite reumatoide di vecchia data, una malattia infiammatoria cronica caratterizzata da aterosclerosi accelerata, aumentate concentrazioni di OPG sieriche sono state indipendentemente associate alla gravità della CAC [104]. L'associazione di elevate concentrazioni di OPG con marcatori di infiammazione e rigidità arteriosa suggeriscono che l'OPG possa fornire un collegamento meccanicistico tra CAC e infiammazione [104-105].

Al di là degli studi di associazione incentrati sulla circolazione coronarica, Clancy et al. hanno riportato un'associazione tra i livelli sierici di OPG e la calcificazione dell'aorta addominale infrarenale in pazienti con malattia vascolare periferica [106].

Il significato prognostico di elevate concentrazioni di OPG come fattore di rischio per la mortalità e la morbilità cardiovascolare sono state confermate in determinate condizioni di aterosclerosi accelerata, come le donne anziane [98], i pazienti in emodialisi [107] e i soggetti diabetici [108-110].

Per ottenere maggiori informazioni sul ruolo dell'OPG nello sviluppo aterosclerotico, gli studi successivi si sono concentrati sulla sua relazione con la disfunzione endoteliale. L'associazione tra elevati livelli di OPG nel siero e la compromissione della funzione endoteliale, misurata come FMD (flow-mediated dilatation) dell'arteria brachiale, è stata dimostrata per la prima volta in uno studio cross-sectional condotto su pazienti diabetici di tipo 2 [111]. A questo hanno fatto seguito studi prospettici su pazienti diabetici di tipo 1 e di tipo 2 di nuova diagnosi che hanno mostrato una correlazione significativa tra la riduzione delle concentrazioni sieriche di OPG e il miglioramento della funzione endoteliale [112]. Anche nelle donne in postmenopausa, elevati livelli di OPG sono stati considerati predittivi di presenza di danno aterosclerotico preclinico misurato come diminuzione della FMD e incremento dell'IMT [113].

Le concentrazioni sieriche di OPG sono state anche correlate all'ipertensione. Stepie'n et al. hanno mostrato come i livelli di OPG siano significativamente elevati nei soggetti ipertesi rispetto ai normotesi. Inoltre, all'analisi di regressione multipla l'infiammazione, l'età e l'ipertensione sono risultati predittori di aumentati livelli di OPG [87]. In un altro studio condotto su pazienti ipertesi sono state osservate correlazioni significative tra i livelli di OPG e l'età, l'altezza, la glicemia, la pressione sistolica, diastolica e di polso, e l'ipertrofia ventricolare sinistra [114]. In questa categoria di soggetti i livelli sierici di OPG nel siero sono stati

positivamente associati anche alla rigidità arteriosa [115].

SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare l'eventuale esistenza di un'associazione tra i livelli plasmatici di OPN e sierici di OPG e due marcatori di danno d'organo, la microalbuminuria (MAU) e l'IMT, in un gruppo di pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale.

MATERIALI E METODI

In accordo con la Dichiarazione di Helsinki e le linee guida istituzionali, i pazienti erano consapevoli della natura sperimentale dello studio e hanno accettato di partecipare previo consenso informato.

In 55 pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale, non trattati farmacologicamente, di età compresa fra i 18 ed i 65 anni, afferenti alla nostra U.O. di Nefrologia ed Ipertensione, abbiamo valutato esami ematochimici di routine, MAU sulla raccolta delle urine delle 24 ore, livelli plasmatici di OPN e livelli sierici di OPG, pressione arteriosa clinica e ambulatoria delle 24 ore e IMT.

Sono stati esclusi i pazienti con ipertensione arteriosa secondaria o maligna, diabete o iperglicemia a digiuno, scompenso cardiaco, storia o segni clinici di cardiopatia ischemica, malattia cerebrovascolare, malattia renale cronica, patologie non cardiovascolari maggiori.

Il giorno dello studio i pazienti sono stati sottoposti ad esame obiettivo generale e a misurazione dei parametri antropometrici e della pressione arteriosa clinica, ottenuta come media di tre valutazioni effettuate a distanza di 1 minuto una dall'altra, dopo un periodo di riposo di almeno 5 minuti in posizione seduta.

Il monitoraggio della pressione arteriosa delle 24 ore (ABPM) è stato effettuato usando un dispositivo portatile non invasivo (SpaceLabs 90207 recorder, Redmond, WA). Sono state considerate solo le registrazioni con un numero di misurazioni valide maggiore del 80%.

Dopo un digiuno di almeno 10 ore ed in posizione supina è stato raccolto il campione ematico necessario per esami ematochimici di routine e dosaggio dei livelli plasmatici di OPN e livelli sierici di OPG.

Il filtrato glomerulare (GFR) è stato stimato con l'equazione CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) [116].

I soggetti sono stati invitati altresì a fornire un campione delle urine delle 24 ore per il dosaggio della MAU.

Mediante tecnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sono stati dosati i livelli plasmatici di OPN (Human OPN Quantikine ELISA Kit; R&D Systems Europe, Ltd., UK & Europe) e i livelli sierici di OPG (Human OPG Cusabio ELISA Kit; Cusabio, USA).

L'esame eco-color-doppler dei tronchi sovraortici è stato eseguito con il paziente sdraiato supino, con il collo esteso ruotato a destra e poi a sinistra. È stata inizialmente analizzata la carotide comune dall'origine alla biforcazione, prima in sezione trasversale e successivamente longitudinale. In B-mode sono state rilevate eventuali placche ed è stato misurato l'IMT. La misurazione è stata effettuata, a livello della carotide comune ad 1 cm dalla biforcazione, a livello della biforcazione e della carotide interna, valutando la parete distale. Per ciascun segmento l'immagine ultrasonografica è stata fissata in più di una direzione; sono state effettuate multiple misurazioni ed è stato considerato l'IMT maggiore e la media degli IMT esaminati a livello dei diversi segmenti.

Metodi statistici

L'analisi statistica è stata condotta usando SYSTAT DATA software package, version 12 (Systat, San Jose, CA).

La distribuzione normale delle variabili continue è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov. Una distribuzione non gaussiana è stata osservata per tutte le variabili esaminate. Per questa ragione abbiamo analizzato questi dati utilizzando test non parametrici.

Le variabili continue sono rappresentate come mediana e range interquartile.

Le differenze fra i gruppi sono state valutate usando il test di Mann-Whitney.

Abbiamo esaminato le correlazioni univariate tra OPN e OPG e le altre variabili esaminate usando i coefficienti di correlazione di Spearman. L'analisi di regressione multipla stepwise backward è stata usata per valutare i correlati indipendenti di OPN e OPG, considerando alternativamente OPN e OPG come variabili dipendenti e età, sesso, BMI (body mass index), eGFR(CKD-EPI), colesterolo totale, trigliceridi, pressione arteriosa clinica o differenziale, pressione arteriosa diastolica o media come covariate.

Una $P < 0.05$ è stata considerata statisticamente significativa.

RISULTATI

Le caratteristiche demografiche e cliniche degli ipertesi essenziali in studio sono presentate nella tabella 1.

La tabella 2 mostra le correlazioni bivariate tra l'OPN e l'OPG e le altre variabili esaminate.

L'OPN e l'OPG non hanno mostrato alcuna correlazione statisticamente significativa, né con l'IMT (Figura 3), né con la MAU (Figura 4).

È stata osservata una correlazione negativa tra l'OPG e il filtrato glomerulare stimato mediante equazione CKD-EPI ($r=0,476$; $p=0,046$) (Figura 5), che tuttavia non ha mantenuto la significatività statistica nel modello regressione multipla, comprendente OPG come variabile dipendente ed età, sesso, BMI, colesterolo totale, trigliceridi, pressione arteriosa sistolica o differenziale, pressione arteriosa diastolica o media come covariate.

I valori di OPN e OPG non differivano tra i soggetti con $IMT < 0,9$ mm ($p=0.569$ e $p=0.766$ rispettivamente) (Figura 6).

Successivamente, i pazienti sono stati divisi in due gruppi in relazione ai valori mediani di OPN (29.4 ng/ml) e sono stati comparati i parametri antropometrici, clinici e bioumorali dei differenti gruppi. Non abbiamo osservato differenze statisticamente significative tra i due gruppi nelle variabili esaminate.

Stesso risultato è stato ottenuto quando i pazienti sono stati suddivisi secondo i valori mediani di OPG (24.8 pg/ml).

DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio mostrano come negli ipertesi essenziali l'OPG e l'OPN non siano correlate né allo spessore intimo mediale carotideo, né alla microalbuminuria.

Ciò sembrerebbe essere in contrasto con i dati ottenuti da precedenti studi.

Janda et al hanno osservato una correlazione positiva tra l'OPG e l'IMT in soggetti con insufficienza renale cronica in predialisi e in emodialisi [117].

Stesso risultato è stato ottenuto in un altro studio condotto su 67 pazienti in dialisi peritoneale [118].

Anche in individui con DMT2 e calcificazioni coronariche l'IMT ha mostrato una correlazione positiva con l'OPN e l'OPG [84].

Inoltre, Morisawa et al hanno osservato una correlazione positiva e indipendente tra l'OPG e l'IMT in 114 pazienti coronaropatici [119].

Tale associazione è stata, per di più, riportata in un esteso studio cross-sectional condotto su popolazione generale, comprendente 6516 soggetti di età compresa fra i 25 e gli 85 anni, ove l'IMT incrementava significativamente al crescere dei terzili di OPG dopo correzione per i tradizionali fattori di rischio cardiovascolare [120].

Le molecole oggetto del nostro studio sono risultate correlate anche alla MAU. Su 2145 adulti con DMT1 che hanno preso parte al Finnish Diabetic Nephropathy Study, l'OPN era associata allo sviluppo di MAU incidente [85].

Tale associazione è stata confermata anche da Talat et al su 60 bambini con la stessa patologia [121].

Medesimo risultato è stato ottenuto analizzando un esteso numero di soggetti cinesi, comprendente 599 normoglicemici, 730 individui con alterata regolazione glucidica (iperglicemia a digiuno e/o intolleranza agli idrati di carbonio) e 327 diabetici [122].

I sopracitati studi, tuttavia, sono stati condotti su popolazioni differenti dalla nostra, che era caratterizzata da ipertesi essenziali.

Alcuni ricercatori hanno analizzato la relazione tra l'OPG, l'OPN e l'ipertensione arteriosa .

Stepie'n et al. hanno osservato come i livelli di OPN e OPG siano maggiori nei soggetti ipertesi rispetto ai normotesi [87]. In un altro studio l'OPG ha mostrato di essere correlato significativamente con l'età, l'altezza, la glicemia, la pressione sistolica, diastolica e di polso, e l'ipertrofia ventricolare sinistra [114]. I livelli sierici di OPG nel siero sono risultati positivamente associati anche alla rigidità arteriosa [115].

Tuttavia, pochi sono i dati che mostrano l'eventuale esistenza di una relazione tra tali molecole e i marcatori di danno d'organo che abbiamo preso in esame nel nostro studio. Kurata et al hanno osservato una correlazione positiva tra l'OPN e l'IMT in 76 soggetti affetti da ipertensione arteriosa essenziale [123]. In questa categoria di pazienti è emersa anche una correlazione tra l'OPG e l'IMT [124]. Infine Tsioufis et al hanno evidenziato un'associazione tra l'OPG e la MAU espressa come ACR (albumin to creatinine ratio) [125].

Nel nostro gruppo di ipertesi essenziali non abbiamo confermato l'esistenza delle sopracitate associazioni. All'analisi di correlazione, infatti, sia l'OPN che l'OPG non risultavano correlate a tali marcatori di danno d'organo.

Inoltre suddividendo l'intero campione in gruppi in relazione ai valori mediani di OPN e OPG, non sono emerse differenze statisticamente significative né nei valori di IMT, né in quelli di albuminuria.

Tuttavia nel nostro studio erano pochi i soggetti con $IMT > 0.9$ e con valori patologici di albuminuria. Probabilmente, essendo per lo più ipertesi di recente diagnosi, anche se non è possibile datare con esattezza l'insorgenza dell'ipertensione, non presentavano quelle alterazioni vascolari che conducono al danno d'organo e che potrebbero in qualche modo dipendere dall'azione dell'OPN e dell'OPG. Di conseguenza il nostro tentativo di evidenziare le relazioni oggetto di tale ricerca potrebbe essere troppo precoce.

Inoltre il nostro studio presenta dei limiti, quali la ridotta numerosità campionaria e la sua natura cross-sectional.

Il ruolo dell'OPN e dell'OPG nel rimodellamento vascolare è stato ampiamente dibattuto.

Alcuni modelli animali sembrerebbero confermarlo. In un modello murino di stenosi vascolare, ad esempio, l'accumulo intimale di cellule muscolari lisce è stato inibito da anticorpi anti-OPN [70]. Sicuramente non è chiaro se la loro azione regolatoria sui processi di calcificazione vascolare, sulla proliferazione di cellule muscolari lisce ed endoteliali e sulla fibrogenesi possa proteggere dal rischio cardiovascolare o incrementarlo. Studi in vivo e in vitro, infatti, hanno prodotto risultati discordanti.

L'OPN sembrerebbe svolgere un ruolo importante nel rimodellamento cardiaco postinfartuale. Topi OPN null, infatti, presentano un'accentuata

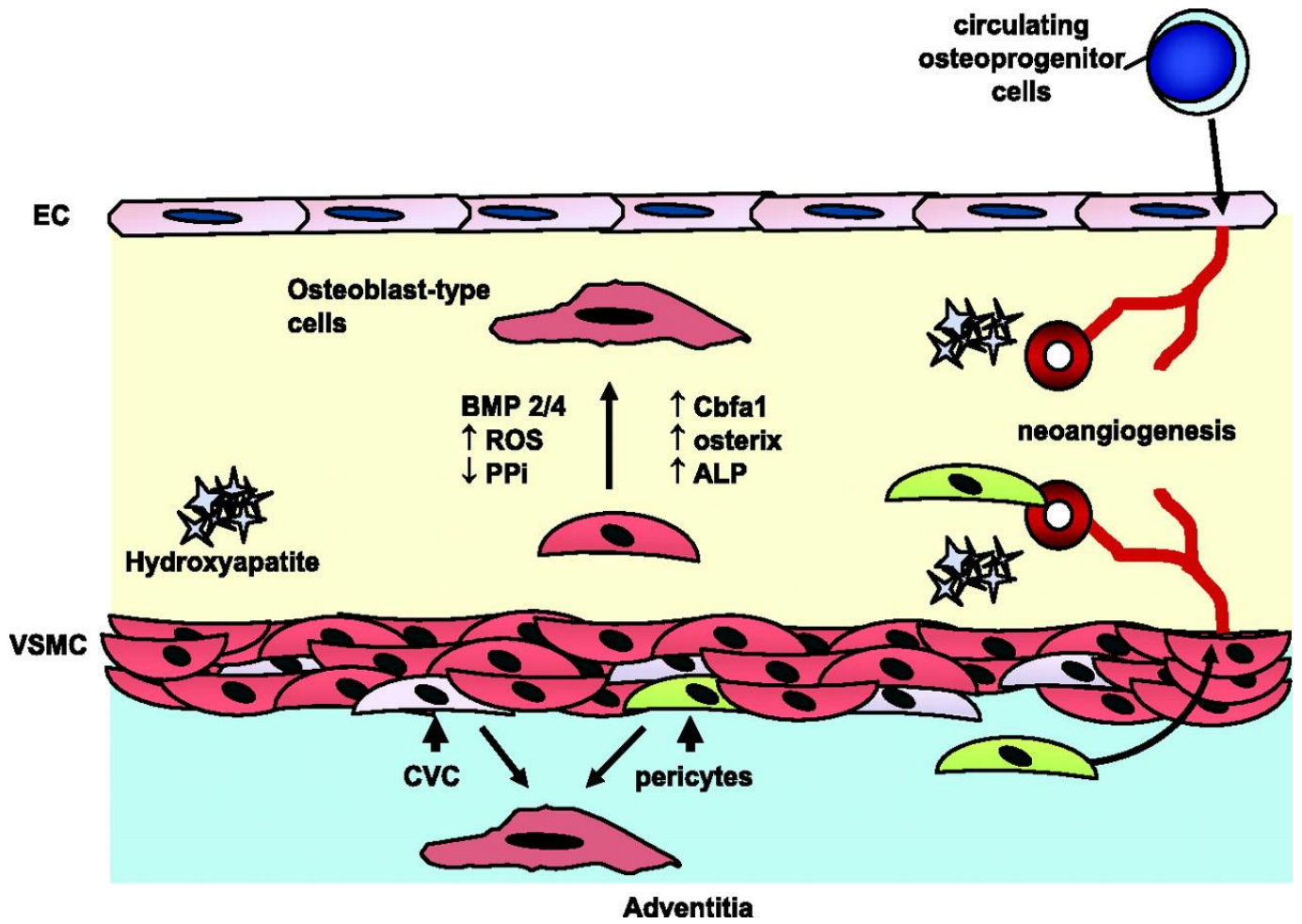
dilatazione ventricolare sinistra dopo infarto miocardico [62].

L'espressione di OPN nei macrofagi e in molti tipi di cellule e la sua sintesi inducibile da un'ampia varietà di mediatori, tra cui l'Angiotensina II, citochine proinfiammatorie e fattori di crescita [30-31,33] determina, in ogni caso, una sua marcata sovraespressione nei tessuti lesi, quali ferite in via di guarigione, lesioni calcificate e aterosclerotiche [35].

Tuttavia l'aumento di tali molecole potrebbe essere semplicemente una risposta compensatoria alla progressione della patologia vascolare, senza avere un ruolo nella sua patogenesi. Ciò potrebbe in parte spiegare l'assenza di correlazione tra di esse e i marcatori di danno d'organo che è emersa dal nostro studio.

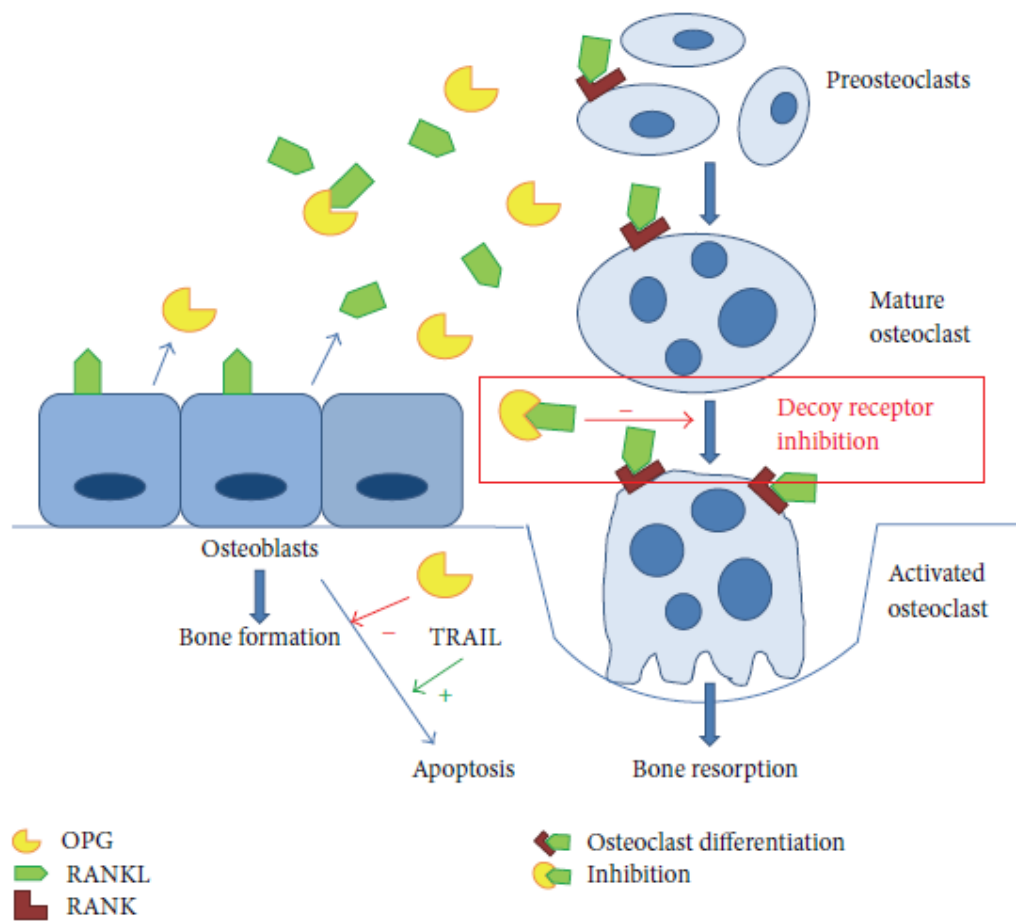
In conclusione, i nostri risultati sembrerebbero escludere un ruolo attivo e precoce dell'OPN e dell'OPG nello sviluppo del danno vascolare conseguente all'ipertensione arteriosa essenziale. Probabilmente l'incremento del numero di studi condotti sui pazienti affetti da patologia potrebbe chiarire i dubbi che persistono sull'esistenza di tale associazione.

FIGURE E TABELLE



C. Johnson et al. Circ Res. 2006;99:1044-1059

Figura 1. Origine delle cellule di tipo osteoblastico



C. Pérez de Ciriza et al. Int J Endocrinol. 2015;2015:564934

Figura 2. Sistema RANK/RANKL/OPG

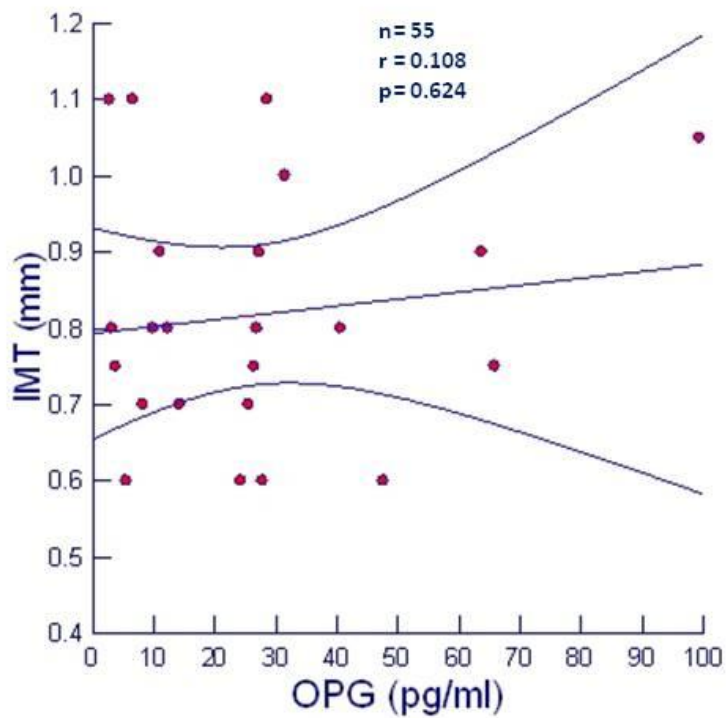
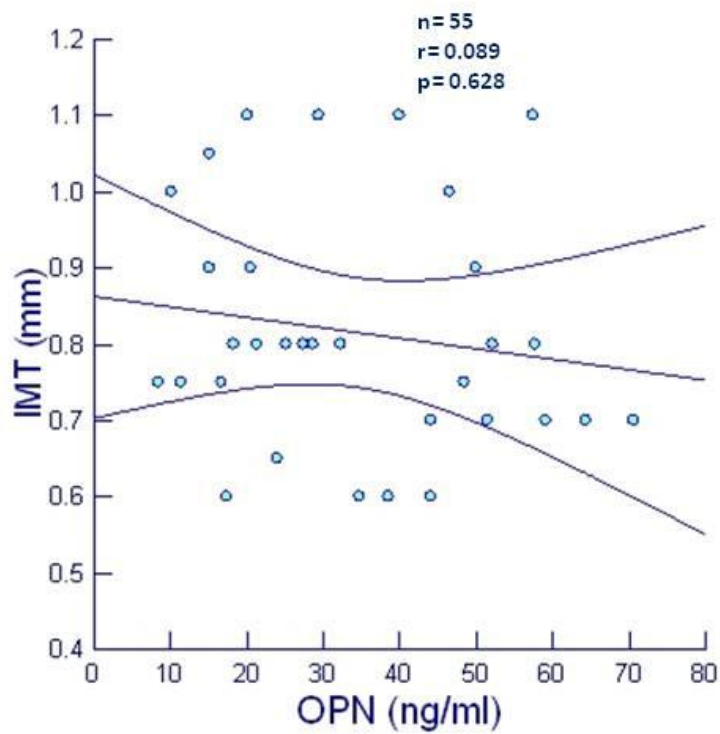


Figura 3. I grafici a dispersione mostrano rispettivamente la relazione tra l'OPN e l'IMT e tra l'OPG e l'IMT. Le linee iperboliche rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% attorno alla retta di regressione.

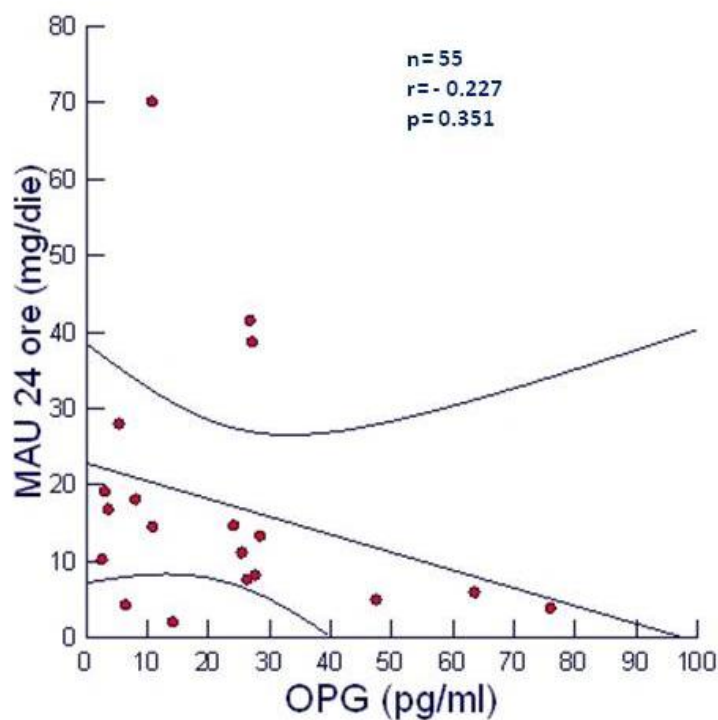
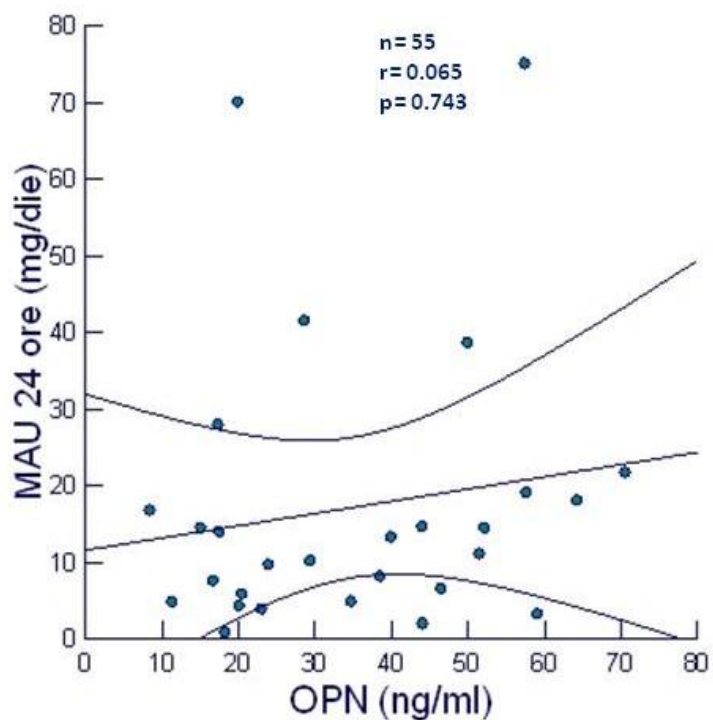


Figura 4. I grafici a dispersione mostrano rispettivamente la relazione tra l'OPN e la MAU e tra l'OPG e la MAU. Le linee iperboliche rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% attorno alla retta di regressione.

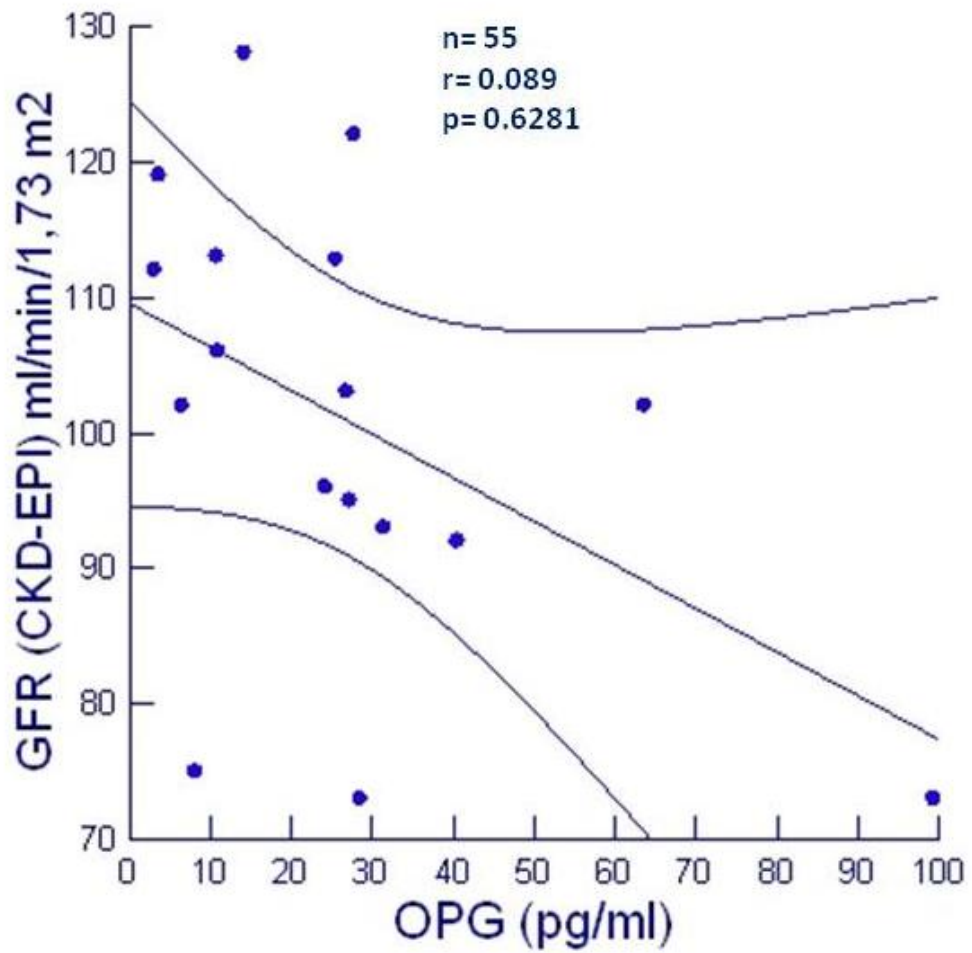


Figura 5. Il grafico a dispersione mostra la relazione tra l'OPG e il eGFR(CKD-EPI). Le linee iperboliche rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% attorno alla retta di regressione.

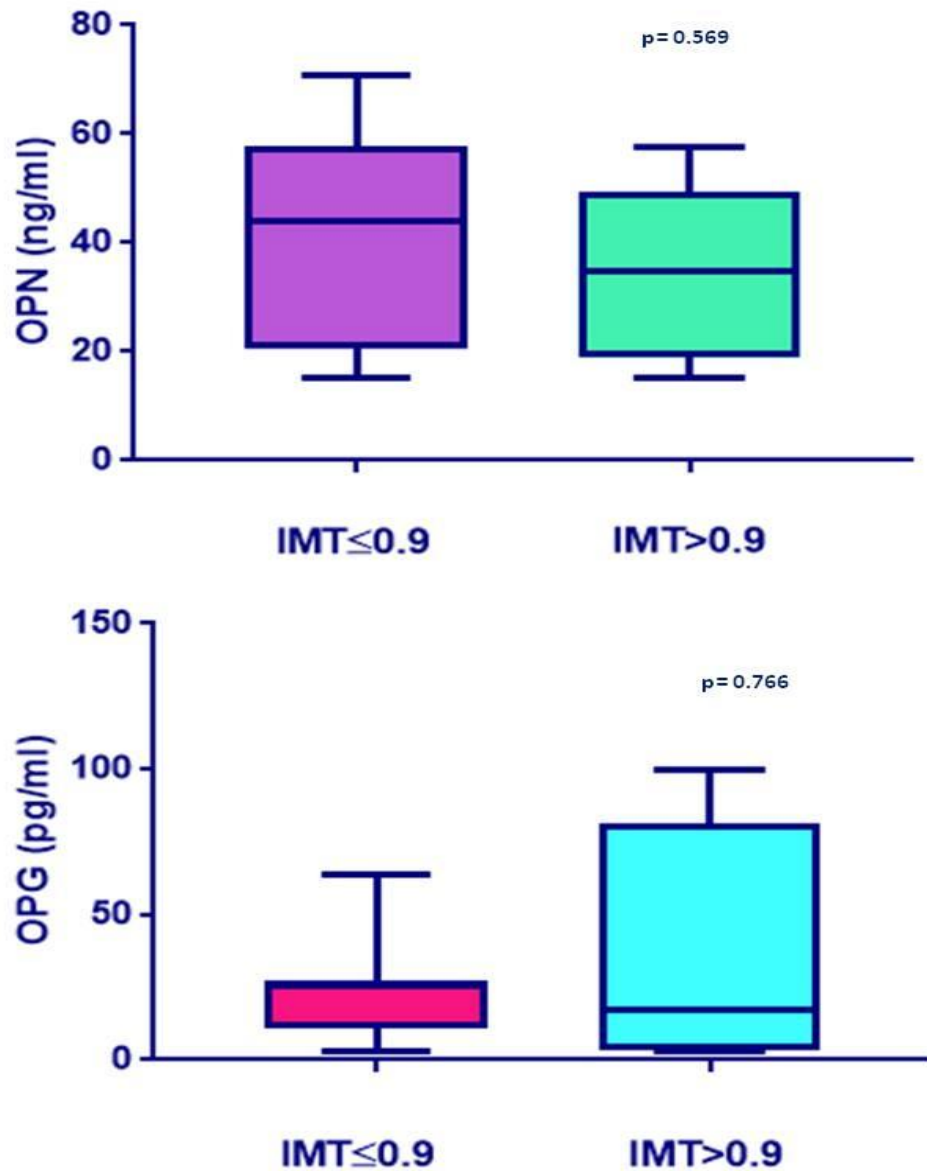


Figura 6. I grafici Box plot mostrano rispettivamente i valori di OPN e OPG negli individui con $IMT \leq$ o >0.9 mm. Le linee centrali rappresentano le mediane, i riquadri centrali i valori dal 25° al 75° percentile, i “baffi” superiori ed inferiori rispettivamente il 95° e il 5° percentile.

Tabella 1: Principali caratteristiche demografiche e cliniche dei 55 ipertesi essenziali

Età, anni	41.6 (31-58)	25-idrossivitamina D, ng/mL	21.2 (14.5-31.7)
Sesso (Maschi), %	56.4	Microalbuminuria (mg/die)	12 (6-19)
Body mass index, Kg/m ²	27.8 (24.5-29.4)	Pressione arteriosa clinica sistolica (mmHg)	141 (134-148)
eGFR(CKD-EPI), ml/min/1.73m ²	103 (95-114)	Pressione arteriosa clinica diastolica (mmHg)	87 (80-93)
Colesterolo totale (mg/dl)	197 (167-214)	Pressione arteriosa clinica differenziale (mmHg)	50 (36-58)
Colesterolo HDL (mg/dl)	49 (39-60)	Pressione arteriosa clinica media (mmHg)	103 (94-110)
Trigliceridi (mg/dl)	106 (66-142)	Pressione arteriosa sistolica delle 24 ore (mmHg)	135 (129-145)
Calcemia (mg/dl)	9.32 (9.1-9.6)	Pressione arteriosa diastolica delle 24 ore (mmHg)	87 (76-91)
Fosforemia (mg/dl)	3.3 (3.1-3.7)	Pressione arteriosa differenziale delle 24 ore (mmHg)	53 (43-60)
Paratormone (pg/ml)	41 (36-54.5)	Pressione arteriosa media delle 24 ore (mmHg)	103 (94-108)
Osteopontina (ng/ml)	29.4 (20.2-48.5)	Spessore intimo-mediale carotideo (mm)	0.77 (0.7-0.9)
Osteoprotegerina (pg/ml)	24.8 (9.8-40.5)		

TABELLA 2: Correlazioni bivariate	OPN		OPG	
	R	p	R	p
Età	-0,139	NS	-0.053	NS
Body mass index, Kg/m²	-0.162	NS	-0.084	NS
eGFR(CKD-EPI), ml/min/1.73m²	0.035	NS	-0.492	0.045
Microalbuminuria sulla raccolta delle urine delle 24 ore	0.178	NS	-0.361	NS
Colesterolo totale	-0.244	NS	0.134	NS
Colesterolo HDL	-0.015	NS	0.219	NS
Trigliceridi	-0.350	NS	-0.187	NS
Pressione arteriosa clinica sistolica	0.099	NS	-0.191	0.046
Pressione arteriosa clinica diastolica	0.013	NS	0.121	NS
Pressione arteriosa clinica differenziale	-0.070	NS	-0.281	NS
Pressione arteriosa clinica media	-0.071	NS	-0.157	NS
Pressione arteriosa sistolica delle 24 ore	0.099	NS	-0.238	NS
Pressione arteriosa diastolica delle 24 ore	-0.092	NS	-0.174	NS
Pressione arteriosa differenziale delle 24 ore	0.275	NS	-0.011	NS
Pressione arteriosa media delle 24 ore	-0.030	NS	-0.160	NS
Spessore intimo-mediale carotideo	-0.183	NS	0.044	NS

BIBLIOGRAFIA

1. Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11201-6.
2. Rubin MR, Silverberg SJ. Vascular calcification and osteoporosis—the nature of the nexus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Sep;89(9):4243-5.
3. Schulz E, Arfai K, Liu X, Sayre J, Gilsanz V. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Sep;89(9):4246-53.
4. Wakasugi M, Wakao R, Tawata M, Gan N, Koizumi K, Onaya T. Bone mineral density measured by dual energy x-ray absorptiometry in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Bone*. 1993;14(1):29-33.
5. Virchow R. Cellular pathology: as based upon physiological and pathological histology. (Chance F, translator; an unabridged and unaltered republication of the English translation originally published by J.B. Lippincott and Co, Philadelphia, 1863). New York: Dover Publications; 1971:404–408.
6. Demer LL, Watson KE, Bostrom K. Mechanism of calcification in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 1994;4:45–49.
7. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*. 1994;90: 844–853.
8. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1983;172:173–177.

9. Giachelli C, Bae N, Lombardi D, Majesky M, Schwartz S. Molecular cloning and characterization of 2B7, a rat mRNA which distinguishes smooth muscle cell phenotypes in vitro and is identical to osteopontin (secreted phosphoprotein I, 2aR). *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 177:867–873.
10. Karsenty G. The complexities of skeletal biology. *Nature.* 2003; 423: 316–318.
11. Demer LL. A skeleton in the atherosclerosis closet. *Circulation.* 1995; 92:2029 –2032.
12. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1993;91:1800 –1809.
13. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res.* 2005;97:105–114.
14. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest.* 1994;93:2106 –2113.
15. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2857–2867.1
16. Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* 2004;66:2293–2299.
17. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003;314:15–23.

18. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003;9: 685–693.
19. McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med.* 2003;9:713–725
20. Doherty MJ, Canfield AE. Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1999;9:1–17.
21. Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation.* 2004;110:2226–2232.
22. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24: 1161–1170.
23. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1998;13:828–838.
24. Tintut Y, Parhami F, Bostrom K, Jackson SM, Demer LL. cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification. *J Biol Chem.* 1998;273:7547–7553.
25. Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res.* 2005;96:930–938.
26. Asou Y, Rittling SR, Yoshitake H, Tsuji K, Shinomiya K, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology.* 2001;142:1325–133.
27. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of

inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107: 1055–106, 2000.

28. Krause SW, Rehli M, Kreutz M, Schwarzfischer L, Paulauskis JD, Andreesen R. Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* 60: 540–545, 1996.

29. Kawamura K, Iyonaga K, Ichiyasu H, Nagano J, Suga M, Sasaki Y. Differentiation, maturation, and survival of dendritic cells by osteopontin regulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 206–212, 2005.

30. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 92: 1686–1696, 1993.

31. Xie Z, Singh M, Singh K. ERK1/2 and JNKs, but not p38 kinase, are involved in reactive oxygen species-mediated induction of osteopontin gene expression by angiotensin II and interleukin-1beta in adult rat cardiac fibroblasts. *J Cell Physiol* 198: 399–407, 2004.

32. Serlin DM, Kuang PP, Subramanian M, O'Regan A, Li X, Berman JS, Goldstein RH. Interleukin-1beta induces osteopontin expression in pulmonary fibroblasts. *J Cell Biochem* 97: 519–529, 2006.

33. Li G, Oparil S, Kelpke SS, Chen YF, Thompson JA. Fibroblast growth factor receptor-1 signaling induces osteopontin expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. *Circulation* 106: 854–859, 2002.

34. Wang X, Loudon C, Ohlstein EH, Stadel JM, Gu JL, Yue TL. Osteopontin expression in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells and carotid artery after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1365–1372, 1996.

35. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 333–345, 2008.
36. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol* 26: 179–184, 2004.
37. Noti JD. Adherence to osteopontin via alphavbeta3 suppresses phorbol ester-mediated apoptosis in MCF-7 breast cancer cells that overexpress protein kinase C alpha. *Int J Oncol* 17: 1237–1243, 2000.
38. Thomas GJ, Speight PM. Cell adhesion molecules and oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 12: 479–498, 2001.
39. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287: 860–864, 2000.
40. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2302–2309, 2007.
41. O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol Today* 21: 475–478, 2000.
42. Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, Kramerova I, Hoffman EP, Liu SD, Miceli MC, Spencer MJ. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. *J Clin Invest* 119: 1583–1594, 2009.
43. Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K, Hughes J, Pichler R, Brown P, Liaw L, Schmidt R, Shankland SJ, Alpers CE, Couser WG, Johnson RJ. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int* 56: 571–580, 1999.

44. Giachelli CM, Speer MY, Li X, et al. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res.* 2005; 96: 717–22.
45. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med.* 2001; 79: 243–53.
46. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA.* 2004; 292: 490–5.
47. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342.
48. Brendan F Boyce and Lianping Xing. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy* 2007, 9(Suppl 1):S1; doi:10.1186/ar2165.
49. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673– 82.
50. Vitovski S, Phillips JS, Sayers J, and Croucher PI. Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-KB or tumor necrosis factor-related apoptosisinducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 43, pp. 31601–31609, 2007.
51. Toffoli B, Bernardi S, Candido R, Zacchigna S, Fabris B, and Secchiero P. TRAIL shows potential cardioprotective activity. *Investigational New Drugs*, vol. 30, no. 3, pp. 1257–1260, 2012.
52. Hunter I. and Nixon G. F. “Spatial compartmentalization of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1-dependent signaling pathways in human airway smooth muscle cells: lipid rafts are essential for TNF- α -mediated

activation of RhoA but dispensable for the activation of the NF- κ B and MAPK pathways,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 45, pp. 34705–34715, 2006.

53. Song JH, Tse MCL, Bellail A et al. Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptotic and nonapoptotic signals in nonsmall cell lung carcinoma cells. *Cancer Research*, vol. 67, no. 14, pp. 6946–6955, 2007.

54. Leverkus M, Walczak H, McLellan A et al. Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis,” *Blood*, vol. 96, no. 7, pp. 2628–2631, 2000.

55. Papadopouli AE, Klonaris CN, Theocharis SE. Role of OPG/RANKL/RANK axis on the vasculature. *Histol Histopathol*. 2008;23:497-506.

56. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12: 1260-1268.

57. Nitta K, Akiba T, Uchida K, Kawashima A, Yumura W, Kabaya T, Nihei H. The progression of vascular calcification and serum osteoprotegerin levels in patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 303-309.

58. Morena M, Terrier N, Jaussent I, Leray-Moragues H, Chalabi L, Rivory JP, Maurice F, Delcourt C, Cristol JP, Canaud B, Dupuy AM. Plasma osteoprotegerin is associated with mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 262-270.

59. Zannettino AC, Holding CA, Diamond P, Atkins GJ, Kostakis P, Farrugia A, Gamble J, To LB, Findlay DM, Haynes DR. 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: 714-723.

60. Yun TJ, Tallquist MD, Aicher A, Rafferty KL, Marshall AJ, Moon JJ, Ewings ME, Mohaupt M, Herring SW, Clark EA. Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *J Immunol.* 2001;166:1482-1491.

61. Singh M, Foster CR, Dalal S, Singh K. Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *J Mol Cell Cardiol* 48: 538–543, 2010.

62. Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, et al. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ Res* 2001;88:1080–1087.

63. Williams EB, Halpert I, Wickline S, Davison G, Parks WC, Rottman JN. Osteopontin expression is increased in the heritable cardiomyopathy of Syrian hamsters. *Circulation* 1995;92:705–709.

64. Graf K, Do YS, Ashizawa N, Meehan WP, Giachelli CM, Marboe CC, et al. Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1997;96:3063–3071.

65. Singh K, Sirokman G, Communal C, Robinson KG, Conrad CH, Brooks WW, et al. Myocardial osteopontin expression coincides with the development of heart failure. *Hypertension* 1999;33:663–670.

66. Sam F, Xie Z, Ooi H, Kerstetter DL, Colucci WS, Singh M, et al. Mice lacking osteopontin exhibit increased left ventricular dilation and reduced fibrosis after aldosterone infusion. *Am J Hypertens* 2004;17:188–193.

67. Subramanian V, Krishnamurthy P, Singh K, Singh M. Lack of osteopontin improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H673–H683.
68. Szalay G, Sauter M, Haberland M, Zuegel U, Steinmeyer A, Kandolf R, et al. Osteopontin: a fibrosis-related marker molecule in cardiac remodeling of enterovirus myocarditis in the susceptible host. *Circ Res* 2009;104:851–859.
69. Giachelli CM, Liaw L, Murry CE, Schwartz SM, Almeida M. Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;760:109 –126.
70. Liaw L, Lombardi DM, Almeida MM, Schwartz SM, deBlois D, Giachelli CM. Neutralizing antibodies directed against osteopontin inhibit rat carotid neointimal thickening after endothelial denudation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:188 –193.
71. Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res*. 2002;91:77– 82.
72. Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 145: 1450–1462, 1994.
73. Ashizawa N, Graf K, Do YS, Nunohiro T, Giachelli CM, Meehan WP, Tuan TL, Hsueh WA. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J Clin Invest* 98: 2218–2227, 1996.
74. Huebener P, Abou-Khamis T, Zymek P, Bujak M, Ying X, Chatila K, Haudek S, Thakker G, Frangogiannis NG. CD44 is critically involved in

infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response. *J Immunol* 180: 2625–2633, 2008.

75. Collins AR, Schnee J, Wang W, Kim S, Fishbein MC, Bruemmer D, Law RE, Nicholas S, Ross RS, Hsueh WA. Osteopontin modulates angiotensin II-induced fibrosis in the intact murine heart. *J Am Coll Cardiol* 43: 1698–1705, 2004

76. Matsui Y, Jia N, Okamoto H, Kon S, Onozuka H, Akino M, Liu L, Morimoto J, Rittling SR, Denhardt D, Kitabatake A, Uede T. Role of osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* 43: 1195–1201, 2004.

77. Mohler ER 3rd, Adam LP, McClelland P, Graham L, Hathaway DR. Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 547–552, 1997.

78. O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, Otto CM. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 92: 2163–2168, 1995

79. Pohjolainen V, Taskinen P, Soini Y, Rysa J, Ilves M, Juvonen T, Ruskoaho H, Leskinen H, Satta J. Noncollagenous bone matrix proteins as a part of calcific aortic valve disease regulation. *Hum Pathol* 39: 1695–1701, 2008.

80. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 107: 2181–2184, 2003.

81. Jian Chen, Yingmin Lu, Damin Huang, Xiaohan Luo, Yachen Zhang. Relationship of osteopontin and renal function with severity of coronary artery lesions. *Int J Clin Exp Med* 2014;7(4):1122-1127.

82. Nitta K, Ishizuka T, Horita S, Hayashi T, Ajiro A, Uchida K, Honda K, Oba T, Kawashima A, Yumura W, Kabaya T, Akiba T, Nihei H. Soluble osteopontin and vascular calcification in hemodialysis patients. *Nephron*. 2001 Dec;89(4):455-8.
83. Berezin AE, Kremzer AA. Circulating osteopontin as a marker of early coronary vascular calcification in type two diabetes mellitus patients with known asymptomatic coronary artery disease Atherosclerosis. 2013 Aug;229(2):475-81.
84. Ishiyama M, Suzuki E, Katsuda J, Murase H, Tajima Y, Horikawa Y, Goto S, Fujita T, Takeda J. Associations of coronary artery calcification and carotid intima-media thickness with plasma concentrations of vascular calcification inhibitors in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009 Aug;85(2):189-96.
85. Gordin D, Forsblom C, Panduru NM, Thomas MC, Bjerre M, Soro-Paavonen A, Tolonen N, Sandholm N, Flyvbjerg A, Harjutsalo V, Groop PH; Finn Diane Study Group. Osteopontin is a strong predictor of incipient diabetic nephropathy, cardiovascular disease, and all-cause mortality in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2014 Sep;37(9):2593-600.
86. Lee CJ, Wang JH, Chen YC, Chen ML, Yang CF, Hsu BG. Serum osteopontin level correlates with carotid-femoral pulse wave velocity in geriatric persons. *Biomed Res Int*. 2014;2014:570698.
87. Stępień E, Wypasek E, Stopyra K, Konieczńska M, Przybyło M, Pasowicz M. Increased levels of bone remodeling biomarkers (osteoprotegerin and osteopontin) in hypertensive individuals. *Clin Biochem*. 2011 Jul;44(10-11):826-31.
88. Hofbauer LC, Schoppet M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet*. 2001;358:257-259.

89. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, et al. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:2117-24.
90. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2000;192:463-474.
91. SchoppetKiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2006;4:801-811
92. Schoppet M, Sattler AM, Schaefer JR, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC. Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:1024-1028.
93. Van Campenhout A, Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2008.
94. Lampropoulos CE, Papaioannou I, D'Cruz DP. Osteoporosis a risk factor for cardiovascular disease? *Nat Rev Rheumatol.* 2012; 8:587-98.
95. Montagnana M1, Lippi G, Danese E, Guidi GC. The role of osteoprotegerin in cardiovascular disease. *Ann Med.* 2013; 45:254-64.
96. Straface G, Biscetti F, Pitocco D, Bertoletti G, Misuraca M, Vincenzoni C, et al. Assessment of the genetic effects of polymorphisms in the osteoprotegerin gene, TNFRSF11B, on serum osteoprotegerin levels and carotid plaque vulnerability. *Stroke.* 2011; 42:3022-8.
97. Biscetti F, Straface G, Giovannini S, Santoliquido A, Angelini F, Santoro L, et al. Association between TNFRSF11B gene polymorphisms

and history of ischemic stroke in Italian diabetic patients. *Hum Genet.* 2013; 132:49-55.

98. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:631-7.

99. Mogelvang R, Haahr-Pedersen S, Bjerre M, Frystyk J, Iversen A, Galatius S, et al. Osteoprotegerin improves risk detection by traditional cardiovascular risk factors and hsCRP. *Heart.* 2013; 99:106-10.

100. Løgstrup BB, Høfsten DE, Christophersen TB, Møller JE, Bjerre M, Flyvbjerg A, et al. Microvascular dysfunction is associated with plasma osteoprotegerin levels in patients with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 2013 24:487-92.

101. Jono S, Ikari Y, Shioi A, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002;106:1192–1194.

102. Rhee EJ, Lee WY, Kim SY, et al. Relationship of serum osteoprotegerin levels with coronary artery disease severity, left ventricular hypertrophy and C-reactive protein. *Clin Sci (Lond)* 2005;108:237–243.

103. Abedin M, Omland T, Ueland T, et al. Relation of Osteoprotegerin to Coronary Calcium and Aortic Plaque (from the Dallas Heart Study). *Am J Cardiol* 2007;99:513–518.

104. Asanuma Y, Chung CP, Oeser A, et al. Serum osteoprotegerin is increased and independently associated with coronary-artery atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2007;195:e135–e141.

105. Kim SM, Lee J, Ryu OH, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with inflammation and pulse wave velocity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:594–598.

106. Clancy P, Oliver L, Jayalath R, et al. Assessment of a serum assay for quantification of abdominal aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2574–2576.
107. Morena M, Terrier N, Jaussent I, et al. Plasma osteoprotegerin is associated with mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:262–270.
108. Anand DV, Lahiri A, Lim E, et al. The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coronary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1850–185.
109. Rasmussen LM, Tarnow L, Hansen TK, et al. Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status, systolic blood pressure, kidney function and cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients. *Eur J Endocrinol* 2006;154:75–81
110. Avignon A, Sultan A, Piot C, et al. Osteoprotegerin: a novel independent marker for silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:2934–2939.
111. Shin JY, Shin YG, Chung CH. Elevated serum osteoprotegerin levels are associated with vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:1664–1666.
112. Xiang GD, Sun HL, Zhao LS, et al. Changes of osteoprotegerin before and after insulin therapy in type 1 diabetic patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007;87:1234–1237.
113. Siepi D, Marchesi S, Vaudo G, et al. Preclinical vascular damage in white postmenopausal women: the relevance of osteoprotegerin. *Metabolism* 2008;57:321–325.
114. Perez de Ciriza C, Moreno M, P. Restituto et al. Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with

subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clinical Biochemistry*, vol. 47, no. 18, pp. 272–278, 2014.

115. Lee CJ, Wang JH, Chen ML, Yang CF, Chen YC, and Hsu BG. Serum osteoprotegerin is associated with arterial stiffness assessed according to the cardio-ankle vascular index in hypertensive patients. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, vol. 22, no. 3, pp. 304–312, 2015.

116. Levey A, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604-612.

117. Janda Katarzyna, Krzanowski Marcin, Mariusz Gajda, Paulina Dumnicka, Danuta Fedak, Grzegorz J. Lis, Piotr Jaśkowski, Agata Pietrzycka, Jan A. Litwin and Władysław Sułowicz. Cardiovascular risk in chronic kidney disease patients: intima-media thickness predicts the incidence and severity of histologically assessed medial calcification in radial arteries. *BMC Nephrology* (2015) 16:78

118. Katarzyna Janda, Marcin Krzanowski, Eve Chowaniec, Beata Kuśnierz-Cabala, Paulina Dumnicka, Andrzej Kraśniak, Piotr Podolec, Władysław Sułowicz. Osteoprotegerin as a marker of cardiovascular risk in patients on peritoneal dialysis. *Pol Arch Med Wewn.* 2013;123(4):149-55.

119. Taichirou Morisawa, Akihiro Nakagomi, Keiichi Kohashi, Munenori Kosugi, Yoshiki Kusama, Hirotsugu Atarashi, and Wataru Shimizu. Osteoprotegerin is Associated With Endothelial Function and Predicts Early Carotid Atherosclerosis in Patients With Coronary Artery Disease. *Int Heart J.* 2015;56(6):605-12.

120. Vik A, Mathiesen EB, Brox J, Wilsgaard T, Njølstad I, Jørgensen L, Hansen JB. Relation between serum osteoprotegerin and carotid intima

media thickness in a general population - the Tromsø Study. *J Thromb Haemost.* 2010 Oct;8(10):2133-9.

121. Talat MA, Sherief LM, El-Saadany HF, Rass AA, Saleh RM, Sakr MM. The Role of Osteopontin in the Pathogenesis and Complications of Type 1 Diabetes Mellitus in Children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2016 Dec 1;8(4):399-404.

122. Niu Y, Yang Z, Li X, Zhang W, Lu S, Zhang H, Chen X, Zhu L, Xing Y, Ning G, Qin L, Su Q. Association of osteoprotegerin with impaired glucose regulation and microalbuminuria: the REACTION study. *BMC Endocr Disord.* 2015 Dec 1;15:75.

123. Kurata M, Okura T, Watanabe S, Fukuoka T, Higaki J. Osteopontin and carotid atherosclerosis in patients with essential hypertension. *Clin Sci (Lond).* 2006 Nov;111(5):319-24

124. Puato M, Rattazzi M, Zanon M, Benetti E, Faggini E, Palatini P, Pauletto P. Predictors of vascular remodelling in hypertensive subjects with well-controlled blood pressure levels. *J Hum Hypertens.* 2015 Sep;29(9):561-5.

125. Tsioufis C, Aggelis A, Dimitriadis K, Thomopoulos C, Kasiakogias A, Tzamou V, Kyvelou SM, Mikhailidis DP, Papademetriou V, Stefanadis C. Relationships of osteoprotegerin with albuminuria and asymmetric dimethylarginine in essential hypertension: integrating vascular dysfunction. *Expert Opin Ther Targets.* 2011 Dec;15(12):1347-53.