

**TC
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ENDOKRİNOLOJİ ÜNİTESİ**

**TİP 2 DİYABETİK VE PREDİYABETİK OLGULARDA
KAROTİS İNTİMA MEDIA KALINLIĞI VE
OSTEOPROTEGERİN RANKL İLİŞKİSİ**

Dr. Şerife Mehlika IŞILDAK

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2008**

**TC
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ENDOKRİNOLOJİ ÜNİTESİ**

**TİP 2 DİYABETİK VE PREDİYABETİK OLGULARDA
KAROTİS İNTİMA MEDIA KALINLIĞI VE
OSTEOPROTEGERİN RANKL İLİŞKİSİ**

Dr. Şerife Mehlika IŞILDAK

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ömer Alper GÜRLEK**

**ANKARA
2008**

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında katkısı olanlara;

Endokrinoloji Ünitesi Başkanı Prof. Dr. Aydan Usman, her aşamada bana destek olan tez danışmanım Prof. Dr. Ömer Alper Gürlek başta olmak üzere tüm Endokrinoloji Bilim Dalı öğretim üyelerine, ultrasonografik ölçümler için Dr. Yakup Yeşilkaya ve Prof. Dr. Deniz Akata'ya, istatistiksel değerlendirmelerdeki eğiticiliği ve yardımları için Doç Dr. Mutlu Hayran'a laboratuvar analizlerdeki yardımlarından ötürü Metin Ödevci'ye, laboratuvar kitlerinin sağlanmasındaki maddi desteğinden ötürü bilim ilaç firmasına ve eğitimime katkısı olan herkese teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

İşildak ŞM. Tip 2 Diyabetik ve Prediyabetik Olgularda Karotis İntima Media Kalınlığı ve Osteoprotegerin RANKL İlişkisi. Hacettepe Üniverstiesi İç Hastalıkları Endokrinoloji Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara 2008

Osteoprotegerin ve RANKL osteoporozdaki rolleri iyi bilinen moleküller olmalarına karşın, aterosklerozdaki etkileri üzerine çalışmalar nisbeten yenidir. Aterosklerotik kalsifikasyon ile osteogenez arasındaki patogenetik benzerlik, araştırmacıları bu moleküllerin damar duvarındaki etkilerini incelemeye yönlendirmiştir. Mikrovasküler komplikasyonu ya da kardiyovasküler olay öyküsü olan kişilerde osteoprotegerin yüksekliği önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada komplikasyonsuz diyabet hastalarında ve prediyabetiklerde ateroskleroz ile osteoprotegerin ve RANKL düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığına bakılmıştır. Çalışmaya alınan olgular Tip 2 Diyabet (n: 20) bozulmuş glukoz toleransı (BGT) (n: 16) bozulmuş açlık glukozu (BAG) (n: 19) ve kontrol grubu (n:23) olarak dörde ayrılmıştır. Olgularda antropometrik ölçümler yapılmış, osteoprotegerin ve sRANKL düzeyi ELISA yöntemi ile ölçülmüş, ultrasonografi ile sağ ve sol karotis intima media kalınlığı (KİMK) ölçülmüş ve ortalama hesaplanmıştır. Tip 2 diyabetiklerde KİMK, diğer gruplara göre- istatistiksel açıdan anlamlı olmayan şekilde- daha yüksek bulunmuştur. Osteoprotegerin RANKL düzeyleri gruplar arasında fark göstermemiştir. Bağntı analizi yapıldığında yalnızca BGT grubunda osteoprotegerin ve KİMK arasında pozitif bir korelasyon ($r = 0,47$) ve kontrol grubunda da RANKL ve KİMK arasında negatif bir korelasyon ($r = 0,45$) bulunmuştur. Tip 2 diyabetiklerde osteoprotegerin ve insulin arasında pozitif yönde ($p < 0,05$ $r = 0,50$) BAG grubunda lipoprotein a ile sRANKL arasında negatif yönde ($p < 0,05$ $r = 0,55$) sağlıklı kontrol grubunda sRANKL ile trigliserit arasında pozitif yönde ($p < 0,05$ $r = 0,42$) bağntı bulunmuştur. Osteoprotegerin ve sRANKL düzeyleri ile LDL, açlık plazma glukozu, homosistein, sCRP arasında ise anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. Araştırmamızın sonuçları bir alt grup için osteoprotegerin ve KİMK ilişkisinin varlığını desteklemektedir. Katılımcıların hiçbirinde aterom plak kalsifikasyonu bulunmamış olması nedeniyle, bu çalışma popülasyonu osteoprotegerin ve ateroskleroz ilişkisinin derecesini tam olarak yansıtamamış olabilir. Prediyabetik kişilerde osteoprotegerin RANKL ve ateroskleroz ilişkisini net olarak değerlendirmek için; ateroskleroza erken dönemde saptamada daha duyarlı yöntemler kullanılmasına ve daha geniş popülasyonların incelenmesine ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: osteoprotegerin, RANKL, ateroskleroz, diyabet, insulin

ABSTRACT

İşildak ŞM. Carotid Intima Media Thickness and Osteoprotegerin and RANKL levels in Type 2 Diabetic and Prediabetic Subjects Hacettepe University School of Medicine Thesis in Internal Medicine -Department of Endocrinology, Ankara 2008

While well known for their roles in osteoporosis, investigations about the effect of osteoprotegerin and RANKL on atherosclerosis are new. The pathogenetic similarity between atherosclerotic calcification and osteoporosis directed the investigators towards examining the effect of these molecules on vessel wall. Former investigations have shown elevated osteoprotegerin levels in patients with mikrovaskular complications or cardiovascular disease. This study looks into whether there is an association between osteoprotegerin and RANKL levels and atherosclerosis in prediabetic and diabetic patients without any complication. Subjects are grouped as Type 2 Diabetics (n:20) impaired glucose tolerance (IGT) (n:16), impaired fasting glucose (IFG) (n: 19) and control group (n:23). Anthropometric measurements are taken from the subjects, osteoprotegerin and SRANKL are measured by ELISA and carotid intima media thickness (CIMT) on right and left sides is measured by ultrasonography and mean value is calculated. CIMT in type 2 diabetics was higher – not significant statistically- when compared to other groups. Groups were not different with regard to osteoprotegerin and RANKL values. Correlation analysis showed a positive correlation between osteoprotegerin and CIMT only in IGT group ($r\ 0,47$) and a negative correlation between RANKL and CIMT in the control group ($r\ 0,45$). A positive correlation between osteoprotegerin and insulin in type 2 diabetics ($p<0,05\ r=0,50$), a negative correlation between lipoprotein a and SRANKL in IFG group ($p<0,05\ r= -0,55$), and a positive correlation between SRANKL and triglyceride levels in healthy controls ($p<0,05\ r=0,42$) are detected. There wasn't any significant correlation between osteoprotegerin and RANKL levels and LDL, fasting plasma glucose, homocystein and sCRP. The results of our study support the association between osteoprotegerin and CIMT in one subgroup. This study population may not reflect the exact degree of association between osteoprotegerin and atherosclerosis since none of the subjects had atheroma plaque calcification. To evaluate the relationship between osteoprotegerin RANKL and atherosclerosis in prediabetic subjects, it is necessary to use a more sensitive method to detect atherosclerosis earlier and to examine larger populations.

Key Words: osteoprotegerin, RANKL, atherosclerosis, diabetes, insulin

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
TABLolar VEŞ ŞEKİL DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 Ateroskleroz ve Diyabet İlişkisi.....	3
2.2 Ateroskleroz ve Kemik Hastalığı İlişkisinde Klinik Kanıtlar	9
2.3 Osteoprotegerin ve RANKL.....	11
2.4 Osteoprotegerin RANKL Ve Ateroskleroz İlişkisi	11
2.5 Osteogenez ve Aterosklerozun Benzerliği	13
3. BİREYLER VE YÖNTEM.....	18
3.1 Çalışma Evreni	18
3.2 Çalışma Planı	18
3.3 Çalışma Protokolü.....	19
3.4 Ölçümler.....	19
3.5 İstatistiksel Analiz.....	20
3.6. Araştırmanın Etik Yönü	21
4. BULGULAR	22
4.1 Olguların Özellikleri	22

4.2 Osteoprotegerin sRANKL ve Karotis Intima Media Kalınlığı	23
5. TARTIŞMA	29
5.1 Osteoprotegerin sRANKL ve Ateroskleroz	29
5.2 Osteoprotegerin ve Diğer Parametrelerle İlişkisi	31
5.3 sRANKL ve Diğer Parametrelerle İlişkisi	32
5.4 Çalışmanın Kısıtlılıkları	33
6. SONUÇLAR –ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKŞ	Açlık Kan Şekeri
BAG	Bozulmuş Açlık Glukozu
BGT	Bozulmuş Glukoz Toleransı
ELISA	“enzyme linked immunosorbent assay”
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
ICAM 1	Intraselüler Adhezyon Molekülü 1
İGSÜ	İleri Glikozilasyon Son Ürünleri
KMD	Kemik Mineral Dansitesi
KİMK	Karotis İntima Media Kalınlığı
KVH	Kardiyovasküler Hastalık
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
NO	Nitrik Oksit
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
RANK	“receptor activator nuclear factor κ B”
RANKL	“receptor activator nuclear factor κ B” ligandı
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
sCRP	duyarlı C reaktif Protein (Ölçüm yöntemi)
sRANKL	Çözünebilir RANK ligandı
TG	Trigliserit
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
VCAM 1	Vasküler hücre adhezyon molekülü 1
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
VKİ	Vücut Kitle İndeksi

TABLÖLAR VE ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 3.1. Çalışmaya alınma kriterleri	18
Tablo 4.1. Olguların demografik ve antropometrik özellikleri	22
Tablo 4.2. Olguların metabolik özellikleri	23
Şekil 2.1. Kemik fizyolojisinde Osteoprotegerin RANK RANKL ilişkisi	12

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No:

Grafik 4.1 Olguların ortalama karotis intima media kalınlıkları	24
Grafik 4.2 a Gruplara göre Osteoprotegerin düzeyleri	25
Grafik 4.2 b Gruplara göre sRANKL düzeyleri	26
Grafik 4.3 BAG olgularında osteoprotegerin ortalama KİMK bağıntısı	26
Grafik 4.3 b Kontrol grubunda sRANKL ve ortalama KİMK bağıntısı.....	27
Grafik 4.4.a Tip 2 Diyabetiklerde Osteoprotegerin İnsulin Bağıntısı.....	27
Grafik 4.4 b BAG grubunda sRANKL ve Lipoprotein a Bağıntısı	28
Grafik 4.4 c Sağlıklı kontrol grubunda sRANKL ve trigliserit bağıntısı.....	28

1. GİRİŞ

Diyabetin tüm formları, ister edinsel ister kalıtsal olsun, hiperglisemi, görece veya mutlak insülin yetmezliği ve diyabete özgü mikrovasküler komplikasyonlar ile karakterizedir Kardiyovasküler hastalık (KVH) tip 2 diyabet hastalarında ölümlerin başlıca nedenidir (1). Framingham çalışmasında diyabetiklerde KVH sıklığının genel toplumun 2-4 katı olduğu ortaya çıkmıştır (2). Makrovasküler hastalığın aşikar diyabetin ortaya çıkmasından daha önce başladığı düşünülmektedir. Çalışmalar göstermiştir ki bozulmuş glukoz toleransı olan bireylerde de makrovasküler hastalık riski artmıştır (3-5)

Vasküler kalsifikasyon ve kemik kaybı arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir fakat bunun nedeni açıklığa kavuşmuş değildir. Von der Recke ve arkadaşları yaptıkları kesitsel bir çalışmada, ortalama yaşı 50+/-2 olan 309 postmenapozal kadından oluşan kohortta kardiyovasküler mortalite ve kemik mineral dansitesi (KMD) arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir (6).

Aterosklerotik kalsifikasyon embryonik osteogenez ile birçok özelliği paylaşır. Amorf mineral yeniden modellenmesinden başlayan, preosteoblastların invazyonunu trabeküler yapıdaki kemiğin oluşmasının izlediği histolojik basamakların benzerlerine aterosklerozda da rastlanmaktadır (7-10).

RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B) T lenfositlerde ve osteoblastlarda bulunan bir transmembran proteinidir. Osteoprotegerin, RANKL ilişkisini bloke ederek osteoklast farklılaşmasını ve kemik rezorpsiyonunu önler (11-13). Çalışmalar kardiyovasküler hastalık varlığında osteoprotegerin düzeylerinin arttığını göstermektedir (14-17). Serum osteoprotegerin düzeyleri kardiyovasküler hastalık ve mortalite ile doğrusal ilişki göstermektedir (18-21). Serum RANKL düzeyi ise kardiyovasküler hastalık ile ters ilişkilidir. (Bzk:21)

Hiçbir komplikasyonu olmayan diyabet olgularında ve prediyabetik olgularda ateroskleroz ile osteoprotegerin düzeylerin arasındaki ilişki henüz literatürde yoktur. Bu çalışmada komplikasyonsuz diyabetik ve prediyabetik olgularda osteoprotegerin ve RANKL ile karotis intima media kalınlığı arasında ilişki olup olmadığını test etmek hedeflenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Ateroskleroz ve Diyabet İlişkisi

Diyabetin tüm formları, ister edinsel ister kalıtsal olsun, hiperglisemi, görece veya mutlak insülin yetmezliği ve diyabete özgü mikrovasküler komplikasyonlar ile karakterizedir (Bkz 1). Bu patoloji başlıca renal glomerülü, retinayı ve periferik sinirleri etkilemektedir. Diyabet aynı zamanda, hızlanmış ateroskleroz ve kardiyak ve serebral arterler ve alt ekstremita arterlerinin etkilendiği makrovasküler hastalık ile de ilişkilidir. Patolojik olarak bu süreç diyabetik olmayanlardaki makrovasküler hastalığı andırmaktadır ama daha yaygın ve ilerleyicidir.

Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'dan toplam 29 merkezde yürütülen DCCT'de ("Diabetes Control and Complications Trial") 1441 tip 1 diyabet hastası 1 ile 15 yıl arasında izlenmiştir. Bu hastalar iki gruba ayrılarak bir gruba Hb A1c'nin %6'ya yakın tutulması hedeflenerek -sıkı glisemik kontrol grubu-, diğer grup ise konvansiyonel hedeflere göre tedavi edilmiştir. Çalışma bittikten sonra katılımcıların yaklaşık %90'ı EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications) çalışmasında izlenmişlerdir. DCCT çalışmasına göre sıkı glisemik kontrol retinopati nöropati ve nefropati riskini sırasıyla %76, %60 ve %50 oranında azaltmaktadır. Makrovasküler hastalık riskine ilişkin sonuçlar ise EDIC'ten gelmiş ve bu analiz, tip 1 diyabette sıkı glisemik kontrolün, herhangi bir kardiyovasküler olay riskini %42, inme ya da kardiyovasküler nedenli ölüm riskini ise %57 oranında azalttığını ortaya koymuştur (22, 23)

Kardiyovasküler hastalık (KVH) tip 2 diyabet hastalarında ölümlerin başlıca nedenidir (Bkz 1). Diyabetle ilgili en geniş çaplı çalışmalardan biri olan UKPDS, tip 2 diyabetiklerde, sıkı glisemik kontrolün mikrovasküler komplikasyonları etkin bir şekilde azalttığını göstermiştir. Oysa aynı çalışmada diyabet kontrolünün myokard enfarktüsü riskini %16 azalttığı bulunmuştur. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir ve hipertansiyon ve hiperkolesterolemi tedavisinin sağladığı yarardan (sırasıyla %21 ve %31 risk azaltımı) geride kalmaktadır (Bkz 4). Bu araştırmada

glukoz düşüşünün az oranda oluşu KVH'da hipergliseminin rolünü net olarak değerlendirmemizi engelliyor olabilir.

Framingham çalışmasında diyabetiklerde KVH sıklığının genel toplumun 2-4 katı olduğu ortaya çıkmıştır (Bkz 2). Framingham kohortu ve bu kohortun ikinci kuşak akrabalarında yapılan bir analizde; 50 yaş üstünde yaşam boyu kardiyovasküler hastalığa yakalanma riski diyabetik kadınlarda %54,8 obez ve diyabetik kadınlarda ise %78,8 erkeklerde ise sırasıyla %78,6 ve %86,9 bulunmuştur (Bkz 2).

Diyabetik olmayanlarda olduğu gibi diyabetik bireylerde de geleneksel risk faktörleri; -hipertansiyon, obezite, hiperlipidemi, sedenter yaşam, sigara-makrovasküler komplikasyonların gelişmesine etki eder (24). Diyabet hastalarında bu risk faktörleri yüksek oranda varsa da bu durum artmış kardiyovasküler hastalık riskini açıklamaya yetmez (25,26).

Diyabete Müdahale Çalışması ("Diabetes Intervention Study" "DIS") ve DECODE çalışması ise myokard enfarktüsü ve KVH'ya bağlı mortalitenin postprandiyal hiperglisemi ile korelasyon gösterdiğini, ama açlık glukoz düzeylerinden etkilenmediğini ortaya koymuştur (27,28)DIS kohortu 1139 tip 2 diyabetik erişkinden oluşmaktadır ve beş yıllık izlemde myokard enfarktüsü oranı %15,2'dir. Myokard enfarktüsü risk faktörleri için yapılan çok değişkenli analizde sigara ve yüksek kan basıncı ile birlikte postprandiyal glukoz yüksekliği de bağımsız risk faktörü olarak saptanmıştır (Bkz 27). Bu da KVH'yı önlemekte postprandiyal hiperglisemi kontrolünün önemini vurgulamaktadır.

Bozulmuş Glukoz Toleransı (BGT) ilk olarak 1980'de WHO tarafından, normal durum ve diyabet arasında kalan bir metabolik durum olarak tanımlanmıştır. 1999'da kriterleri yeniden gözden geçiren WHO açlık glukozunu daha çok vurgulamış ve bozulmuş açlık glukozunu (BAG) tanımlamıştır (29,30). Her iki metabolik durum da ileride diyabet geliştirme riski ile ilişkilidir ama özellikle BGT kardiyovasküler risk artışından sorumlu tutulmuştur. Epidemiyolojik açıdan bakıldığında Hoorn çalışması (31) Honolulu Kalp çalışması (32) ve Chicago kalp çalışması (33) OGTT sonrası ikinci saatte ölçülen glukozun kardiyovasküler risk artışı ile ilişkisini ortaya koymuş çalışmalardır. Benzer şekilde Güney yarıküre toplumlarında yapılan bir araştırmada, normal açlık glukozu olduğu halde ikinci saat

ölçümü yüksek olan kişilerde kardiyovasküler riskin iki katına çıktığı saptanmıştır (34). Yirmi çalışmanın bir arada değerlendirildiği ve toplam 95783 bireyi kapsayan bir metaanaliz, 2 saat glukozu ile kardiyovasküler risk arasındaki bağlantıyı doğrulamaktadır (35). Bu çalışmada kurulan regresyon modeline göre açlık plazma glukozu 75 mg/dl referans değer kabul edildiğinde açlık plazma glukozunun 110mg/dl oluşu rölatif riski 1,33'e çıkarmaktadır. İkinci saat glukozunun 140 mg/dl olması durumunda ise kardiyovasküler hastalık için rölatif risk 1,58 olmaktadır.

Mikroalbuminüri olan tip 2 diyabetiklerde, hem hipergliseminin hem de diğer geleneksel risk faktörlerinin sıkı kontrolünün, mikrovasküler komplikasyonları ve kardiyovasküler hastalık riskini yaklaşık %50 oranında azalttığı Steno 2 çalışmasında gösterilmiştir. (36)

Makrovasküler hastalığın aşikar diyabetin ortaya çıkmasından daha önce başladığı düşünülmektedir. Çalışmalar göstermiştir ki bozulmuş glukoz toleransı olan bireylerde de makrovasküler hastalık riski artmıştır (3-5). Diyabeti ya da bozulmuş glukoz toleransı olmayan bireylerde bile, iyi bilinen kardiyovasküler risk faktörlerine göre düzeltme yapıldığında insulin direnci KVH riskini iki kat artırıyor görülmektedir (37). “Study to Prevent NIDDM” STOP-NIDDM olarak çalışmasında bozulmuş glukoz toleransı olan 1418 olguya 300mg/gün akarboz veya plasebo verilmiş ve olgular diyabet geliştirme ve kardiyovasküler hastalık riski açısından izlenmişlerdir. Sonuçta ilacın, bozulmuş glukoz toleransı olgularında KVH ve hipertansiyon riskini azalttığı saptanmıştır (38). STOP NIDDM grubunun bir alt çalışmasında, akarbozun karotis intima media kalınlığını da plaseboya kıyasla anlamlı biçimde azalttığını göstermiştir (39).

İnsulin direnci için tipik olan lipid profili, düşük “yüksek dansiteli lipoprotein” (HDL) yüksek “çok düşük dansiteli lipoprotein” (VLDL) ve yüksek “küçük yoğun düşük dansiteli lipoprotein” (LDL) ile karakterizedir. Bu profil insuline dirençli adipositlerden serbest yağ asiti (sya) salınımının artmasına bağlıdır. Hem düşük HDL hem de yüksek küçük yoğun LDL düzeyi makrovasküler hastalık için bağımsız birer risk faktörüdür. Hepatositlere artmış sya girişi VLDL sekresyonunu artırır. Kolesterol ester transfer proteini varlığında VLDL, HDL ve LDL'ye yüksek miktarda trigliserit transfer eder ve HDL ve LDL'nin kolesterol esterden fakirleşmesine neden olur. Ortaya çıkan trigliseritten zengin HDL,

karaciğere daha az kolesterol ester taşır. Öte yandan trigliseritten zengin ve kolesterol esterden fakir LDL, normalden daha küçük ve yoğundur ve böylelikle damar duvarını kolayca geçip okside olabilir (40). İnsülin direnci ile endotel disfonksiyonu arasında ilişki olduğunu gösteren araştırmalar vardır (41,42). In vitro çalışmalar insulinin hem proaterojenik hem de antiaterojenik etkilerini saptamıştır (43,44). İnsülinin başlıca antiaterojenik etkisi endotelden nitrik oksit (NO) salınımını artırmasıdır. NO plateletlerin agregasyonu ve damar duvarına yapışmasının güçlü bir önleyicisidir. NO, aterogeneizde rol alan genlerin transkripsiyonunu da kontrol etmektedir. Monosit kemoatraktan protein (MCP -1) CD 11 /CD18 P selektin ve VCAM-1 (vasküler hücre adhezyon molekülü) gibi yüzey adhezyon moleküllerinin ve intraselüler adhezyon molekülü-1'in (ICAM-1)ekspresyonunu azaltır. NO, vasküler geçirgenliği de azaltarak LDL oksidasyonunu yavaşlatır. NO vasküler düz kas hücre proliferasyonunu da önler (45) .

İnsulinin proaterojenik etkilerine gelince, başlıca iki etkisi, PDGF'ye (platelet kökenli büyüme faktörü) bağlı vasküler düz kas hücre çoğalmasını artırmak ve vasküler düz kas hücrelerinden PAI- 1 (plasminojen aktivatör inhibitörü) üretimini uyarmaktır (46,47). İnsulinin NO üretimini artırmak için kullandığı sinyal iletim yolağı ile, düz kas hücreleri üzerindeki etkisini sağlayan sinyal iletim yolağı birbirinden farklıdır. Bu nedenle diyabetik ateroskleroza arteriyel hücrelerde “yolak –seçici” insulin direncinin etki ettiği sanılmaktadır. Bu tür seçici vasküler dirence ilişkin kanıt hayvan modellerinde gösterilmiştir (48).

Hiperglisemi endotelden NO üretimini artırır (49). Benzer şekilde hiperglisemi vasküler düz kas hücre proliferasyonunu ve PAI -1 üretimini de artırır (50). Hiperglisemi, bunlardan başka, ICAM-1 ve VCAM-1 düzeylerini, (51,52) kolajen tip IV ve fibronektini (53) artırmak gibi proaterojenik etkiler gösterir.

İnsüline dirençli aortik endotel hücrelerinin, sya'yı oksitlemesi sonucu iki önemli enzimin inaktif hale geldiği bulunmuştur; prostasiklin sentaz ve eNOS (endotelyal nitrik oksit sentaz). Bu durum; yağ asiti oksidasyonunun hız kısıtlayıcı enzimi olan karnitin palmitoil transferaz 1'in etkisizleştirilmesiyle tersine çevrilebilmektedir (54).

Normalde kalp ya da beyinde olan bir akut iskemiye yanıt olarak ortaya çıkan yeni damar oluşumu, hastalarda morbidite ve mortaliteyi azaltan bir onarım sürecidir.

Dolaşımdaki endotelial öncü hücreler, hasar bölgesindeki ekstraselüler matriks hücreleri ile birlikte hareket ederek yeni damar oluşumunu sağlarlar. Fakat deneysel diyabet modellerinde öncü endotelial hücrelerin sayısı azalmıştır ve işlevsizdirler. Benzer durum diyabetik insanlarda da gösterilmiştir (55).

Hiperglisemiye bağlı hasarın mekanizmaları

Hipergliseminin nasıl diyabet komplikasyonlarına yol açtığına dair, dört farklı hipotez vardır:

- Poliol yolağı
- İntraselüler İGSÜ oluşumu
- Protein kinaz C'nin aktivasyonu
- Heksozamin yolağı

Poliol yolağına Artmış Akım: Aldoz redüktaz, glukoz ve daha birçok karbonil bileşiğinin nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) 'a bağımlı indirgenmesinin katalizörü olan bir enzimdir. NADPH glutatyonun rejenerasyonu reaksiyonunda kofaktördür. Aldoz redüktazın glukozla afinitesi düşüktür ve normal serum glukoz konsantrasyonunda bu yolla glukoz kullanımının ancak küçük bir yüzdesini oluşturur. Fakat artmış glukoz konsantrasyonu varlığında enzimatik olarak sorbitole dönüşüm artar ve NADPH düzeyi de buna paralel olarak düşer. Poliol yolağında sorbitol, sorbitol dehidrogenaz enzimi aracılığıyla fruktoza dönüşürken NAD⁺ da NADH'ya indirgenir. Bu yolağın kullanımı türden türe ve dokudan dokuya değişkenlik gösterebilir, örneğin tavşan lensinde glukoz kullanımının %33'ü bu yolla olurken insan eritrositinde bu oran %11'dir. Artmış sorbitolün ozmotik stres oluşturması, sitozolde NADH/NAD⁺ oranının artması ve sitozolde NADPH'nin azalması, poliol yolağının potansiyel zararlı etkilerini açıklamak için ileri sürülmüş mekanizmalardır. Sorbitolün hücre zarından kolaylıkla geçemeyişinin ozmotik hasara yol açtığı düşünüldüyse de diyabetik modellerde dokuda ölçülen sorbitol düzeyleri çok düşüktür. NADPH'nin tükenmesi ise glutatyon rejenerasyonunu engellemektedir. Bu da hücre içinde oksidatif stresi artırmaktadır (56).

Artmış İntraselüler İleri Glikozilasyon Son Ürünleri Yapımı: İleri Glikozilasyon Son Ürünleri İGSÜ'ler diyabetik modellerin retinal damarları ve glomerülleri gibi ekstraselüler yapılarda bulunmaktadır. İGSÜ'ler glukozun

glikoksale otooksidasyonu, Amadori ürününün 3 deoksiglukozona ayrışması, gliserialdehid 3 fosfatın metilglikoksale parçalanması sonucu oluşabilir. Bu reaktif intraselüler dikarboniller intraselüler ve ekstraselüler proteinlerin amino grupları ile reaksiyona girerek İGSÜleri oluştururlar (57). İGSÜlerin makrovasküler komplikasyonlardaki rolüne daha ayrıntılı olarak değinilecektir.

Protein kinaz C'nin aktivasyonu: Protein kinaz C'ler (PKC) en az 11 izoformdan oluşan bir ailedir ve bu izoformlardan dokuzunun aktivasyonunda ikinci mesajcı olarak diasilgliserol (DAG) görev yapmaktadır. İntraselüler hipergliseminin hücre kültürlerinde ve diyabetik hayvan modellerinde DAG miktarını artırdığı gösterilmiştir(58). Yine aynı deneylerde artmış de novo DAG yapımının PKC'yi aktifleştirdiği de gösterilmiştir. Deneysel diyabet modellerinde PKC β -izoformunun aktivasyonu ile NO miktarının azaldığı ve renal glomerüllerde kan akımının bozulduğu gösterilmiştir (59). PKC aktivasyonu ayrıca endotel hücre kültüründe insulinle uyarılmış eNOS mRNA ekspresyonunu da engellemektedir (60). Artmış glukoz düzeyleri ile tetiklenen PKC aktivasyonunun düz kas hücrelerinde geçirgenliği artıran bir faktör olan vasküler endotelial büyüme faktörünü(VEGF) artırdığı da bulunmuştur (61). PKC, hücre kültürlerinde TGF β fibronektin ve tip IV kolajen ekspresyonunu da artırarak mikrovasküler matrikste madde birikimine de katkıda bulunmaktadır (Bkz 62). PKC, hücre zarındaki çeşitli NADPH bağımlı oksidazları aktive etmektedir. PKC inhibitörlerin diyabetik hastaların koroner damarlarında *-ex vivo-* denenmesi, NADPH oksidazlar tarafından süperoksit radikalleri oluşmasını önlemiştir (62).

Heksozamin yolağına artmış akım: Hipergliseminin yol açtığı komplikasyonların mekanizmasına dair yeni bir hipotez de glukozun heksozamin yolağına kaymasıdır. Bu yolda fruktozamin, glikoliz yerine, proteoglikan sentezi ya da O- bağılı glikoproteinler için gereken substratları sağlamaya yönelmiştir. Bu yoldaki hız kısıtlayıcı enzimin inhibisyonu ile hiperglisemiye bağılı TGF α ve TGF β transkripsiyon artışının durdurulduğu gösterilmiştir (63). Heksozamin yolağının hiperglisemiye bağılı aktivasyonu insan koroner arter endotel hücrelerinde ve diyabetiklerin karotis plak hücrelerinde matriks metaloproteinaz (MMP)-2 ve MMP-9 'un aktivasyonunu artırmaktadır (64).

İGSÜ'lerin Makrovasküler Komplikasyonlardaki Rolü

Ekstraselüler matrikste oluşan İGSÜler damar elastisitesini bozmakta ve nitrik oksiti etkisizleştirmektedir ki bu, diyabetiklerde endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmasını açıklayabilir (Bkz 53). Düşük molekül ağırlıklı lipoprotein LDL'nin İGSÜ modifikasyonu, plazmanın LDL'den temizlenmesini güçleştirmektedir. İGSÜ'lerin reseptörlerine (RİGSÜ) bağlanması ile hücre içinde reaktif oksijen türleri oluşur ve bu da damar duvarında yer alan transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktifleşmesine yol açar. NF- κ B çeşitli ateroskleroz ilişkili genleri aktive eder; (ICAM 1, vasküler hücre adhezyon molekülü-1, MCP-1, PAI-1, doku faktörü, VEGF ve İGSÜ reseptörü gibi) (65). İGSÜ'ler aynı zamanda mikrovasküler perisitlerde osteoblastik farklılaşmayı da başlatırlar. Bu farklılaşma, vasküler kalsifikasyona katkıda bulunmaktadır (66). Renin angiotensin sisteminin de makrovasküler hastalık sürecinde rolü olduğu düşünülmektedir. İGSÜ'lerin reseptörlerine bağlanmasıyla, Angiotensin II aracılı düz kas hücre çoğalması artmaktadır (67).

İGSÜ inhibitörlerinin Aterosklerozu Önlemesi

Diyabetik ve apolipoprotein E'den yoksun fare modelinde, farelere çözünebilir RİGSÜ verilerek İGSÜ-RİGSÜ ilişkisi bozulduğunda, aterosklerozun yavaşladığı görülmüştür (68). Çözünebilir RİGSÜ alan hayvanlarda, aterosklerotik lezyon yağlı çizgilenme aşamasında kalmış ve aterosklerotik lezyon sayısı çarpıcı şekilde azalmıştır.

Kolesterol ile beslenen tavşanlarda İGSÜ düzeyleri ile ateromların derecesi arasında bir ilişki olduğu ve bu tavşanlara İGSÜ oluşumunu önleyen aminoguanidin verildiğinde anti aterojenik etki sağlandığı bildirilmiştir (69).

Oksidatif Stresin KVH'daki rolü

Diyabette reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumunun çeşitli mekanizmaları vardır. Vasküler hücre kültüründe, yüksek glukoz düzeyinin, ROT oluşumunu, NADPH oksidazın, protein kinaz C aracılı aktivasyonu ile artırdığı görülmüştür (70). Hipergliseminin poliol yolağını etkin hale getirmesi, hücre içinde NADH/NAD düzeyinin artmasına, ve vasküler düz kas hücrelerinde protein kinaz C nin

aktivasyonuna neden olur, bu da ROT oluşumunu hızlandırır (Bkz 70). Artmış oksidatif stres nitrik oksiti inaktif hale getirir. Nitrik oksitin kaybı da NF-κBnin daha etkili olmasına zemin hazırlar (71).

2.2 Ateroskleroz ve Kemik Hastalığı İlişkisinde Klinik Kanıtlar

Vasküler kalsifikasyon ve kemik kaybı arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir fakat bunun nedeni açıklığa kavuşmuş değildir. Vasküler kalsifikasyon ve osteoporoz ortak risk faktörlerini paylaşmaktadır (yaşlanma, inflamatuvar hastalıklar, kronik böbrek yetmezliği, östrojen eksikliği, glukokortikoid kullanımı gibi) (Bkz 14,15).

Osteoporoz hastalarının lateral lumbar spinal grafilerinde sıklıkla aorta duvarında kalsiyum birikimi gözlenir (72).

Rotterdam çalışma grubu hiperhomosisteineminin bağımsız kardiyovasküler risk faktörü olmak yanında osteoporozla da ilişkili olduğunu bildirmiştir (73). İn vitro çalışmalarda okside lipoprotein ve interlökin 6 (IL 6) ve tümör nekroz faktörünün (TNF) proaterojenik etkilerinin yanı sıra (74) osteoblast farklılaşmasını da önlediği ve kemik kaybına neden olduğu gösterilmiştir (75). Buna paralel olarak hayvan deneylerinde kemik oluşumunu uyardığı saptanan statinlerin (76) gözlemsel çalışmalarda da postmenapozal kadınlarda kırık riskini azalttığı ortaya konmuştur (77).

Von der Recke ve arkadaşları yaptıkları kesitsel bir çalışmada, ortalama yaşı 50+/-2 olan 309 postmenapozal kadından oluşan kohortta kardiyovasküler mortalite ve kemik mineral dansitesi (KMD) arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir (Bkz 6). Bu çalışmaya göre ön kol KMD’de her bir standart sapma azalma kardiyovasküler mortaliteyi 2 kattan daha fazla artırmaktadır. Aynı çalışma, yaş ortalaması 70+/- 2 olan 704 kadında da, KMD’de her bir standart sapma azalma için iki kat artmış kardiyovasküler mortalite olduğunu ortaya koymuştur. Diğer kardiyovasküler risk faktörleri düzeltildiğinde bile KMD ile mortalite arasındaki bu ilişki anlamlılığını korumuştur. Geniş bir geriatric kadın popülasyonunda (n= 6046) yapılan başka bir araştırmada topukta ya da kalçada yapılan DEXA(“dual energy X ray absorpsiometry”) ölçümlerinde her bir standart sapma azalma için kardiyovasküler hastalıktan ölüm riski %30 artmış bulunmuştur (78).

MORE (“Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation”) çalışmasında plasebo alan 2576 postmenapozal kadında osteoporoz ve osteopeni ile düşük kardiyovasküler sağkalım arasında ilişki olduğu görülmüştür. Dört yıllık izlem sonunda osteoporozu olanların osteopenik olan olgulara göre 4 kat daha fazla kardiyovasküler olay riski taşıdıkları bulunmuştur (79).

Prospektif yapılmış bir kohort çalışmasında 1236 kadın ortalama 30 yıl izlenmiş ve koroner arter hastalığı ilişkili mortalite ile metakarpal korteks alanı arasında ters ilişki bulunmuştur (80). Ayrıca Rotterdam kohortunu inceleyen van der Klift ve arkadaşları, periferik arteriyel hastalık ve düşük KMD arasında bağımsız bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (81).

İki büyük epidemiyolojik çalışma; NHANES I ve III (“National Health and Nutrition Examination Survey”) erkeklerde kardiyovasküler hastalık ve düşük KMD arasında ilişki olduğunu bildirmiştir, ama bu çalışmada kadınlarda benzer bir ilişkiye rastlanmamıştır (82-83). Trivedi ve arkadaşlarınca yapılan bir başka çalışmada 65-75 yaş arası erkekler 4-8 yıl boyunca izlenmiş ve kalça KMD’si ile kardiyovasküler mortalite arasında ters ilişki saptanmıştır (84).

Aterosklerozun, karotis intima media kalınlığı (85) ve vasküler kalsifikasyon (86) gibi işaretleri ile düşük kemik mineral içeriği arasında bağlantı olduğunu gösteren çalışmalar vardır, ancak başka bazı çalışmalarda benzer sonuç elde edilmemiştir (87,88). Bu çelişkili sonuçlar çalışmalarda farklı KMD ölçüm yöntemlerinin kullanılmış olmasıyla açıklanabilir.

Framingham araştırmacıları, yüzde metakarpal korteks alanı kaybı ile lateral grafilerdeki aorta kalsifikasyonun ilerlemesi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (Bkz 72). Yirmi beş yıllık takipte 364 kadında toplam % 22,4 MKA kaybına paralel olarak aorta kalsifikasyonunun sekiz kat arttığı saptanmıştır. Kemik kitlesinin ve aorta kalsifikasyonunun bilgisayarlı tomografi ile değerlendirildiği 2348 sağlıklı postmenapozal kadın üzerinde yapılan retrospektif bir araştırmada, omurga KMD’si ile aorta kalsifikasyonu arasında ters ilişki bulunmuştur (89).

2.3 Osteoprotegerin ve RANKL

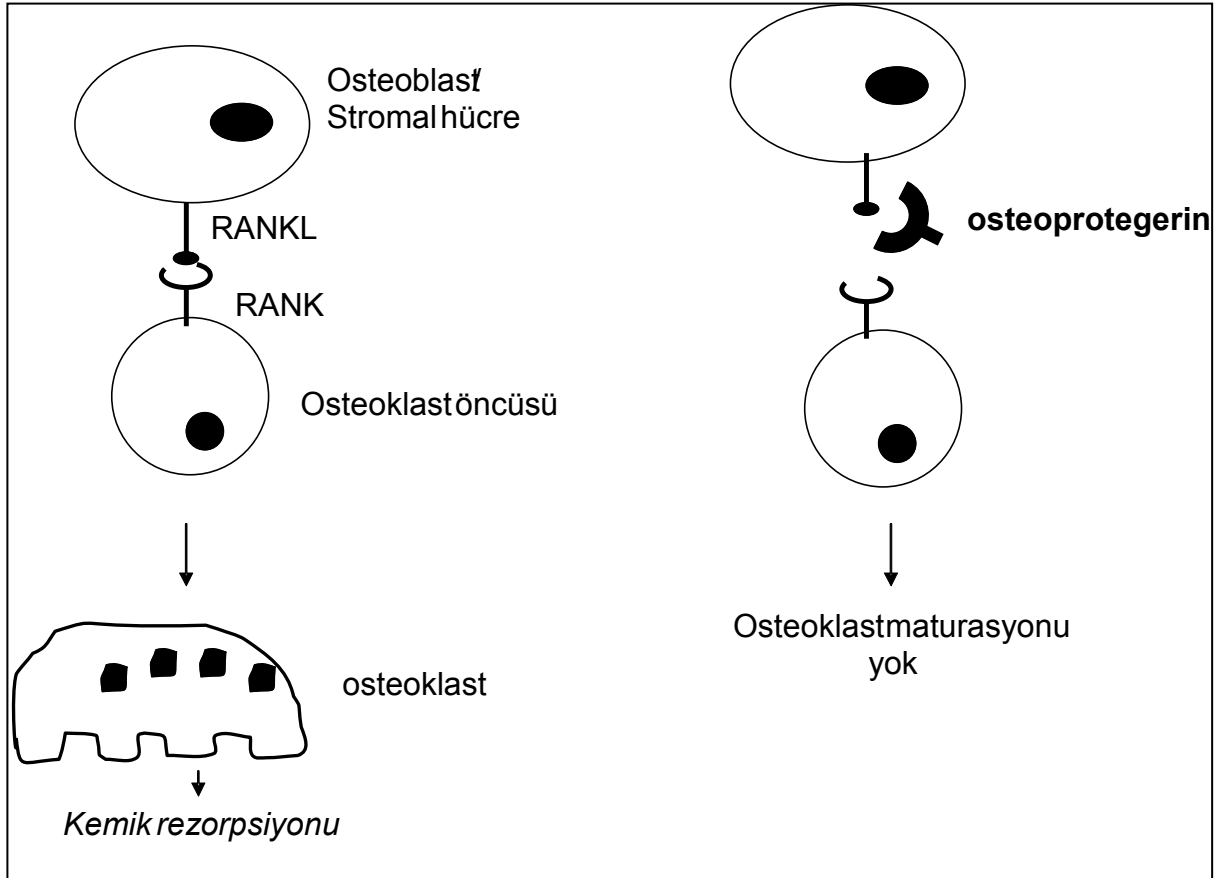
RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B) T lenfositlerde ve osteoblastlarda bulunan 316 amino asitten oluşan bir transmembran proteindir. RANKL, T hücrelerinden salınan ya da hücre yüzeyinden koparılmış iki aktif çözünür formuyla da bulunur.

Osteoklast aktivasyonu için RANK'ın RANKL'a (RANK ligandı) bağlanması şarttır (90). Kemikte RANKL osteoblastlar ve ilik hücrelerinde bulunur ve preosteoklast yüzeyindeki RANK'a bağlandığında osteoklastik farklılaşma ve matürasyonu başlatır (Bkz 11) osteoprotegerin, RANK RANKL ilişkisini bloke ederek (Şekil 2.1) osteoklast farklılaşmasını ve kemik rezorpsiyonunu önler (Bkz 12, 13).

Osteoblast serisinde RANKL ekspresyonu düşük düzeydeyse de inflamatuvar sitokinler, 1,25 dihidroksi vitamin D3 ve deksametazon hızlı döngülü kemik sahalarında RANKL ekspresyonunu artırır. Bu osteolitik faktörler aynı zamanda osteoprotegerin ekspresyonunu da engeller (91,92). RANKL, TNF α dönüştürücü enzim ile çözünebilir (sRANKL) forma dönüşür. Diğer TNF reseptör ailesi üyeleri gibi RANK da –preosteoklastlarda- NF- κ B ve Jun-N-terminal kinaz aktivasyonu üzerinden çalışmaktadır (93). RANK RANKL ve osteoprotegerin'ye sırasıyla “TNF süperailisi üyesi 11 11a ve 11b” de denmektedir (94).

2.4 Osteoprotegerin RANKL Ve Ateroskleroz İlişkisi

Ekstraselüler matriksin biyomineralizasyonu ya da kalsifikasyonu kemik dış ve büyüme plağı kıkırdağı gibi dokuların gelişmesi için gerekli olan fizyolojik bir olaydır. Ancak normalde mineralize olmayan dokularda kalsifikasyon istenmeyen sonuçlara yol açar. Arterlerin kalsifikasyonu ileri yaşta ya da diyabet veya son dönem böbrek yetmezliği gibi metabolik hastalıklarda görülebilir. Bu kalsifikasyon, inflamatuvar sitokinlerle veya kalsiyum fosfor dengesinde bozulma ile tetiklenebilir (95,96).



Şekil 2.1. Kemik fizyolojisinde Osteoprotegerin RANK RANKL ilişkisi

Vasküler kalsifikasyon histolojik olarak dört grupta incelenebilir. Bunlardan biri kalsiyum fosfor homeostazının bozulduğu durumlarda ortaya çıkar. Diğer üç tipte ise kalsiyum fosfor dengesi normaldir. Bu üç tip morfolojik olarak şöyle sınıflanabilir: (97)

- Kalp kapakçıklarının kalsifikasyonu
- İntima kalsifikasyonu: makrofajlar, lipid ve vasküler düz kas hücrelerin de bulunduğu bir süreçte intima tabakasında kalsifikasyonu; ateroskleroz
- Media kalsifikasyonu: son dönem böbrek yetmezliğinde ve diyabette olduğu gibi elastin fiberlerin mineralizasyonu nedeniyle media tabakasında bulunması

İntima kalsifikasyonu, sitokinler ve aterojenik lipidler tarafından tetiklenmektedir (98). Media kalsifikasyonunda ise yüksek leptin düzeyi (99), hiperfosfatemi (100), üremi (101), hiperkalsemi (102), hiperparatiroidi (103), varfarin (104), ve 1 alfa 25 dihidroksi vitamin D3 (105) gibi çok sayıda etken rol

oynamaktadır. Bir kişide hem intima hem media kalsifikasyonu bir arada olabilir ve bunda birden fazla mekanizma etkin olabilir.

Vasküler kalsifikasyon, birçok regülatör moleküllerin aktivasyonu veya inhibisyonu, modülatör proteinlerin aktivasyonu, hücrelerin farklılaşması ve işlevlerinin düzenlenmesinin karmaşık bir ilişkiler ağı olarak yürüdüğü bir süreçtir. RANK RANKL ve osteoprotegerin'nin de bu süreçte rol oynadığına ilişkin kanıtlar giderek artmaktadır.

Hayvan deneylerinde osteoklastik kemik rezorpsiyonunu önleyen osteoprotegerin'nin kemik kaybını azaltırken, arteriyel kalsifikasyonu da engellediği gösterilmiştir (106).

2.5 Osteogenez ve Aterosklerozun Benzerliği

Aterosklerotik kalsifikasyon embryonik osteogenez ile birçok özelliği paylaşır. Amorf mineral yeniden modellenmesinden başlayan, preosteoblastların invazyonunu trabeküler yapıdaki kemiğin oluşmasının izlediği histolojik basamakların benzerlerine aterosklerozda da rastlanmaktadır (108,109). Osteojenik faktörler ve kemik proteinleri; örneğin: kemik morfogenetik proteini 2 (BMP-2), Msx-2, Cbfa1 ve osteopontin gibi, aterosklerotik kalsifikasyonda da yer almaktadır (109).

In Vitro Modellerde Vasküler Osteogenez

Vasküler düz kas hücreleri, adventisyal myofibroblastlar ve kardiyak myofibroblastlar osteoblastik belirteçler taşır ve kemik mineral hidroksiapatiti üretirler (110,111). Bu süreç BMP 2 ve diğer osteojenik transkripsiyonel regülatörler tarafından yönetilmektedir (Bkz 109). Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) (112), kollajen tip IV ve laminin (113), osteopontin (114), ekstraselüler fosfat (115), PTH ilişkili peptid ve PTH (116), bu işlemi yavaşlatmaktadır.

Osteoprotegerin Nakavt Fare Modelinde Vasküler Kalsifikasyon

Osteoprotegerin geni nakavt ("knockout") fare modellerinde ciddi osteoporoz ve arteriyel kalsifikasyonun bir arada oluşu osteoprotegerin'nin aterosklerozdaki rolü konusunda ilk ipucu olmuştur. osteoprotegerin nakavt farelerde erken başlangıçlı

osteoporoza ek olarak deneklerin 2/3'ünde renal ve aortik arterlerde media kalsifikasyonu olduğu saptanmıştır-bu arterler hayvanda osteoprotegerin'nin yoğunlukta bulunduğu yerlerdir (117,118). Osteoprotegerin -/- farelerde bu kalsifikasyon histolojik olarak 2 haftada görülmeye başlanmış ve 2 ayda belirgin hale gelmiştir ve renal arter ve aorta dışında daha küçük damarlarda kalsifikasyon olmamıştır. İlginç olarak kalsifiye arterlerde normal mürin arterlerinde bulunmayan RANK ve RANKL eksprese edildiği saptanmış ve RANKL eksprese eden hücrelere komşu olarak çok çekirdekli RANK + osteoklast benzeri dev hücreler olduğu görülmüştür. Ne var ki fare modelinde renal ve aortik arterlerde aterosklerotik plak görülmemiştir. Ayrıca insanda osteoprotegerin geninin homozigot olarak kaybı juvenil Paget hastalığında yol açarken vasküler bir hastalığa yol açmamaktadır (119).

Tersine, osteoprotegerin -/- farelere gestasyon sırasında transgenik olarak osteoprotegerin sağlanması vasküler kalsifikasyonu önlemekte ama postnatal dönemde geçici osteoprotegerin enjeksiyonları oluşmuş mineralizasyonu geri döndürememektedir, oysa her iki durumda da osteoporoz düzelebilmektedir (Bkz 118). Osteoprotegerin, kalsifiye arteriyel duvarda artmış RANK ve RANKL ekspresyonu ile karakterize kemik yeniden modellenmesine benzer bir süreci inhibe ederek vasküler kalsifikasyonu önlemektedir. Bu bulgular osteoprotegerinin vasküler dokuda mineralizasyonu önlerken kemik dokuda da mineralizasyonu artırdığı düşüncesini desteklemektedir.

Osteoprotegerin ve Diğer Hayvan Modelleri

Sıçanlarda yapılan bir deneyde varfarin ya da yüksek doz D vitamini ile tetiklenen kalsifikasyonun parenteral osteoprotegerin verilmesiyle önlendiği görülmüştür (Bkz 106). Osteoprotegerin elbette hayvan modelinde vasküler kalsifikasyon konusunda üzerinde çalışılan tek molekül değildir. Vasküler kalsifikasyon matriks GLA proteini olmayan fare modellerinde de görülmektedir. Matriks GLA proteini (MGP), fizyolojik bir mineralizasyon inhibitörüdür ve vasküler düz kas hücreleri ve kondrositler tarafından salgılanır. MGP; kalsifiye aterosklerotik lezyonlarda yoğun bulunan ve mezenkimal hücre farklılaşmasını artıran bir osteogenik sinyal olan BMP -2'yi (Bone Morphogenic Protein -2) bağlamak yoluyla mineralizasyonu baskılayabilir. osteoprotegerin -/- farelerle karşılaştırıldığında, MGP

-/- hayvan modellerinde yaygın olarak tüm arterlerin kalsifikasyonu gözlenir. MGP ve osteoprotegerin arasında bir bağlantı olup olmadığı henüz bilinmemektedir. B glukozidaz ilişkili gen, “klotho” mutasyonu taşıyan farelerde arterlerin media tabakasında kalsifikasyon olması ve serum osteoprotegerin düzeylerinin yükselmesi kayda değerdir (Bkz 101-104). Endojen klotho proteini nitrik oksit üzerinden kardiyovasküler koruma sağlar. Diyabet ve kronik hipertansiyon gibi insanda vasküler kalsifikasyonun ve osteoprotegerin düzeylerinin arttığı durumlarda sıçanların da böbreklerinde klotho proteini azalmaktadır. Klotho-/- farelerde senil osteoporozu taklit eder bir durum olması, bu protein ile osteoprotegerin arasındaki ilişkiye dikkat çekmektedir.

Normal ve Patolojik Damarda RANK RANKL ve Osteoprotegerin Ekspresyonu

Osteoprotegerin kalp arter ve venlerin de içinde olduğu çok sayıda doku tarafından üretilmektedir (Bkz 14, 15). Hem endotel hücreleri hem de vasküler düz kas hücreleri osteoprotegerin üretmektedir. Tersine; RANKL’ın insanda aorta lezyonlarında (Bkz 100), kemirgen cilt kapillerlerinde (Bkz 117) veya kemirgenlerin metafizyel damarlarında (Bkz 11) zayıf ekspresyonu bildirilmişse de, RANK ve RANKL normal damarda ve kalsifiye olmamış kalp kapakçığında sıklıkla gösterilememiştir.

Osteoprotegerin değişmemiş ya da azalmış olsa da, aterosklerotik lezyonlarda, kalsifiye damar veya kapakçıklarda RANK ve RANKL artmış ve osteoprotegerin ile birlikte eksprese ediliyor olabilir (Bkz 100, 188). Artmış RANKL/osteoprotegerin oranı aterosklerozun inflamatuvar doğasına uygun görünmektedir, çünkü endotel hücresinde osteoprotegerin azalırken RANKL artmaktadır (120). Bazı açılardan aterosklerotik plak kalsifikasyonu, embriyonik kemik oluşumunu andırmaktadır, çünkü arteriyel kalsifikasyon, osteoblast ve osteoklast hücrelerinin anahtar özelliklerine sahip hücreleri barındırmaktadır ve trabekülleri, lakunaları ve ilik adacıklarıyla lamellar kemiğe dönüşebilir (Bkz 110) ve mineralize matriks yeni damar oluşumuyla osteoid halini alabilir. RANKL ve osteoprotegerin’in varlığı, aterosklerotik lezyonların erken ve geç aşamalarında gösterilmiştir. osteoprotegerin mineralize lameller kemiğe benzer yapının sınırlarında

yer alırken, RANKL komşu matrikste bulunur ve çevresinde de RANK + osteoklast benzeri hücrelerin varlığı gösterilmiştir (121). Belki de osteoblast benzeri hücrelerde üretilen RANKL, osteoklast çoğalması ve işlevinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Ayrıca RANKL, kemokin salınımını, MMP-9 (matriks metaloproteinaz 9) etkinliğini ve monosit makrofaj göçünü uyarabildiğinden aterojenik lezyonun gelişmesindeki bu önemli basamaklarda da etkin olabilir (122,123). Kalsifik aortik stenozda da inflamatuvar sürece ek olarak aktif kemik gelişimi programı da başlamakta ve histolojik olarak RANKL ve osteoprotegerin boyanması artmaktadır (Bkz 105). Arteriyel medial kalsifikasyonda ise osteoprotegerin boyanması artmışken RANKL az miktarda saptanmıştır (Bkz 121) Genel olarak artmış RANKL düzeylerinin damar kalsifikasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ancak vasküler kalsifikasyonda serum osteoprotegerin düzeylerinin arttığı da gösterilmiştir ve dolaşan osteoprotegerinin vasküler kalsifikasyonu mu başlattığı ya da kalsifikasyon sürecini durdurmaya yönelik biyolojik bir tepkiyi mi yansıttığı açık değildir.

Serum Osteoprotegerin ve RANKL Düzeyleri ve Vasküler Kalsifikasyon Arasındaki İlişki

Endotel yüzeyinin genişliği dikkate alındığı zaman, ölçülen serum osteoprotegerin düzeylerine endotel hücrelerinin ve vasküler düz kas hücrelerinin önemli katkısı yadsınamaz. Çalışmalar kardiyovasküler hastalık varlığında osteoprotegerin düzeylerinin arttığını göstermektedir (Bkz 14,15)

Artmış serum osteoprotegerin düzeyleri ileri yaş, diyabet, hipertansiyon, artmış kardiyovasküler mortalite, koroner arter hastalığı ve kronik böbrek yetmezliği ile korele bulunmuştur. (Bkz 15,111) Tersine, immünsüpresif veya kortikosteroid alanlarda osteoprotegerin düzeyleri düşmektedir (Bkz 16,116). Serum osteoprotegerin düzeyleri seks hormon düzeyleriyle de ilişkilidir. Kadınlarda serum osteoprotegerin düzeyleri daha yüksektir ve postmenapozal kadınlarda düşerken hormon replasman tedavisi ile yükselmektedir (124). Genel olarak bakıldığında serum RANKL düzeyleriyle osteoprotegerin arasında doğrudan bir ilişki gösterilememiştir (Bkz 14,15) Bütün bu çalışmalar göstermiştir ki serum osteoprotegerin düzeyleri vasküler kalsifikasyon varlığında artmaktadır. Bu veriler, osteoprotegerin'nin kalsifikasyonun başlaması ve ilerlemesinde önemli rolü

olduğunu akla getirmektedir. (Bkz 14,15) Osteoprotegerin gen polimorfizmi ile ateroskleroz ilişkisine bakıldığında promoter bölgedeki bir nükleotid polimorfizminin karotis arter intima media kalınlığında artış ile bağlantılı olduğu açığa çıkmıştır (Bkz 112). Fare deneylerinde yaşlanmayla birlikte serum osteoprotegerin düzeylerinin arttığı ve kemik osteoprotegerin düzeylerinin osteoblast kaybı ve osteoklast artışına paralel bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Bkz 114).

Vasküler Hücreler Üzerine RANKL RANK Osteoprotegerin Sisteminin Doğrudan Etkisi

Vasküler endotel hücrelerinde ve düz kas hücrelerinde osteoprotegerin ekspresyonu IL 1ve TNF α ile artar (125). Vitamin D3'ün intima media kalsifikasyonunda rol aldığı düşünülmektedir ve osteoprotegerin damarlarda vitamin D3'e bağlı olduğu sanılan endotel kalsifikasyonunu önlemektedir.

Klinik Kardiyovasküler Hastalık

Serum osteoprotegerin düzeyleri kardiyovasküler hastalık ve mortalite ile doğrusal ilişki göstermektedir (Bzk 18-21). Serum RANKL düzeyi ise kardiyovasküler hastalık ile ters ilişkilidir. (Bkz 21). Bu çelişkili görünebilir ama koruyucu faktörlerin hastalık varlığında yüksek olması kompensatuar bir yanıt da olabilir. Bir başka fikir de osteoprotegerin'nin dolaşımında artmış ama damar duvarında artmamış olmasıdır. Çünkü endotel hücrelerinde depolanan osteoprotegerin seçici olarak ekzositoz ile dolaşıma verilmektedir.

Yakın zamanda yapılan Dallas kalp çalışmasının bir analizinde 30-65 yaş arası 3386 olguda osteoprotegerin düzeyleri düzeyleri ölçülmüş ve bilgisayarlı tomografi ile koroner kalsifikasyon ve manyetik rezonans görüntüleme ile aorta kalsifikasyonu değerlendirilmiştir. Çoklu regresyon analizleri yapıldığında osteoprotegerin'in koroner arter ve aortik plak kalsifikasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır (126).

3. BİREYLER VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Evreni:

Hacettepe Üniversite Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji Ünitesine başvuran diyabetik ve prediyabetik olgular çalışmaya kabul edildi. Kontrol grubu yine ünitemize başvuran ve oral glukoz tolerans testi normal olup, (basit diffüz guatr ve basit nodüler guatr dışında) bilinen dahili sorunu olmayan olgulardan seçildi. Çalışmaya dahil edilme kriterleri Tablo 3.1’de sunulmuştur.

3.2 Çalışma Planı

Katılımcılardan çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarına ilişkin yazılı onam alındı.

1. Katılımcıların kan basıncı ölçümleri ve sistemik fizik incelemeleri yapıldı
2. Vücut ağırlığı ve boy ölçümleri alınıp vücut kitle indeksleri (vki) hesaplandı.
3. Bel ve kalça çevreleri ölçüldü.
4. Triseps biseps ve subskapularis bölgeleri üzerinden cilt katlantı kalınlıkları ölçüldü.
5. Hastalardan osteoprotegerin ve RANKL ölçümü alınan serum örnekleri - 80°C’de saklanıp daha sonra toplu olarak çalışıldı.

Tablo 3.1: Çalışmaya alınma kriterleri

Çalışmaya Alınma Kriterleri
• Yaş: 40-65 • Malign hastalık öyküsü olmamak
Çalışma Dışı Bırakılma Kriterleri
• Kardiyovasküler hastalık öyküsü • Serebrovasküler hastalık öyküsü • Periferik vasküler hastalık öyküsü • Morbid obezite • Serum kreatinin > 1,5 mg/dl olmak • Karaciğer transaminazları 3 kat veya daha fazla yüksek olmak

3.3 Çalışma Protokolü

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Erişkin Endokrinoloji Ünitesine başvuran olgular çalışmaya uygunluk açısından sözü edilen kriterlere göre değerlendirildikten sonra, glukoz toleranslarına göre dört farklı grup oluşturuldu. Bilinen tip 2 diyabeti olmayan tüm olgulara oral glukoz tolerans testi (OGTT) yapıldı. Olgular, Amerikan Diyabet Cemiyeti 2008 kılavuzuna uygun olarak; bozulmuş açlık glukozu ve bozulmuş glukoz toleransı gruplarına ayrıldı ve glukoz toleransı normal bulunan olgular kontrol grubuna alındı. Basit diffüz guatr ya da basit nodüler guatr nedeniyle başvuran ve glukoz toleransı normal olan kişilerden tiroid fonksiyonları normal olanlar da kontrol grubundan dışlanmadı. Tip 2 diyabeti olanlarda HbA1c düzeyi %9 ve üzerinde olan olgular çalışmaya alınmadı. Olguların antropometrik ölçümleri ve demografik verileri kaydedildi. Olgulardan, 10 saatlik açlığı takiben, sabah 8:30-9:30 arasında, böbrek fonksiyon testi, karaciğer enzimleri, lipid profili, C reaktif protein, lipoprotein a, homosistein, insulin için kan alındığı gibi, osteoprotegerin ve RANKL için de kan örnekleri alındı. Osteoprotegerin ve RANKL için alınan kan örnekleri 4000 devirde 20 dakika süreyle santrifüj edilip, ayrılan serum örnekleri -80° C’de tüm olgular tamamlanana kadar saklandı. Diğer örnekler aynı gün içinde değerlendirildi. Olgular Radyoloji Bölümüne yönlendirildi ve orada sağ ve sol karotis intima media kalınlıkları ultrasonografik olarak ölçüldü.

3.4 Ölçümler

Çalışmaya alınan olgularda aşağıdaki ölçümler yapıldı.

Vücut ağırlığı (kg): Olgular, üzerlerinde yaklaşık 0,1 kg’lık ince giysiler olduğu halde ve ayakkabı olmaksızın aynı tartı ile tartıldı.

Boy (cm): Olgular dik durumda iken baş- ayak tabanı mesafeleri çalışma boyunca aynı mezür kullanılarak ölçüldü.

Bel ve kalça çevresi (cm): Bel çevresi, krista iliaka ve son kot mesafesinin ortasından ve kalça çevresi kalçanın en geniş yerinden mezür ile ölçüldü.

Vücut Kitle İndeksi (VKİ) (kg/m²): VKİ =vücut ağırlığı (kg)/ (Boy)² (cm) formülü ile hesaplandı.

OGTT: Tip 2 diyabeti olanlar dışındaki katılımcılara OGTT yapıldı. On- on iki saatlik açlığı takiben, sabah 8:30-9:00 arasında 0. dakika örnekleri alınıp 75 gram

glukoz (250 cc %30 dekstroz çözeltisi) içirildi. 120. dakikada glukoz için tekrar kan alındı. Glukoz ölçümleri ünitemiz laboratuvarında glukoz oksidaz tekniği ile spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. (Human Gesellschaft Wiesbaden Germany)

İnsulin: Açlık insülin düzeyi ölçümü, immünoradyometrik yöntemle hazır kitler kullanılarak yapıldı. (Immunotech IRMA, Czech Republic) Yöntem-içi ve yöntemler arası varyasyon katsayıları sırasıyla %4,3 ve %3,4'dü.

Osteoprotegerin (pmol/L): Santrifüj sonrası - 80°C'de saklanmış olan serum örnekleri ELISA yöntemi (enzyme linked immunosorbent assay) ile hazır kitler kullanılarak (Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4) yapıldı. Yöntem-içi ve yöntemler arası varyasyon katsayıları sırasıyla %4 ve %7 idi.

Çözünebilir RANKL (sRANKL) (pmol/L): Santrifüj sonrası - 80°C'de saklanmış olan serum örnekleri ELISA yöntemi (enzyme linked immunosorbent assay) ile hazır kitler kullanılarak (Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4) yapıldı. Yöntem-içi ve yöntemler arası varyasyon katsayıları sırasıyla %3 ve % 6 idi.

Karotis İntima Media Kalınlığı (mm): Karotis intima media kalınlığı sağ ve sol arteria carotis communis üzerinden siemens allegra ultrasonografi cihazı 7.5 Mhz lineer transdüser ile ölçüldü. Ortalama karotis intima media kalınlığı hesaplandı.

3.5 İstatistiksel Analiz:

SPSS 10,0 kullanılarak analiz edildi.

Değişkenler: Sürekli değişkenler, normal dağılıma uymadıklarından veriler ortanca ve minimum ve maksimum değerler olarak verildi.

Karşılaştırma Testleri: Ortanca saptanan değerler için *Kruskal Wallis* testi uygulandı.

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bağıntı (korelasyon) analizi: Sürekli ölçümle belirlenen tüm değişkenler arasında doğrusal ilişki arandı. İlişki katsayısı 'r' ile anlamlılık ise 'p' ile belirtildi. Bağıntı analizi için *Spearman* bağıntı katsayısı kullanıldı.

3.6. Araştırmanın Etik Yönü:

Çalışma kesitsel olarak dizayn edildi. Olguların almakta olduğu tedavilere müdahale edilmedi. Olgulardan yazılı onam formu alındı. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulundan onay alındı. (Etik kurul Görüşme Tarihi: 6.3.2008 Karar No: HEK 08/16)

4. BULGULAR

4.1 Olguların Özellikleri

Çalışmaya toplam 78 katılımcı alındı. Katılımcılardan 17'si erkek 61'i kadındı. Katılımcılar glukoz toleranslarına göre; Tip 2 diyabet (n:20), bozulmuş glukoz toleransı (BGT) (n: 16), bozulmuş açlık glukozu (BAG) (n:19) ve sağlıklı kontrol (n:23) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Buna göre kontrol grubunda VKİ diğer gruplara kıyasla daha düşük (ortanca 26,08 kg/m²) ve yaş ortalaması daha gençti (ortanca yaş: 45) Diyabetik olguların fizik incelemelerinde otonom ya da periferik nöropati lehine bulgu yoktu ve göz dibi bulguları normaldi Diyabetik olguların hiçbirinde mikroalbuminüri saptanmadı.. Olguların demografik özellikleri antropometrik ölçümleri ve metabolik parametreleri Tablo 4.1 ve 4.2'de özetlenmiştir.

Gruplar arasında cinsiyet dağılımı, postmenapozal kadın sayısı ve sigara içiciliği açısından fark yoktu. Tip 2 Diyabet, BGT ve BAG grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında; hipertansiyon ve hiperlipidemi sıklığı açısından ve VKİ açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 4.1. Olguların demografik ve antropometrik özellikleri

<i>Değişkenler</i>	<i>Tip 2 diyabet n=20</i>	<i>BGT n=16</i>	<i>BAG n=19</i>	<i>Kontrol n=23</i>	<i>p değeri</i>
	<i>Ortanca (minimum- maksimum)</i>	<i>Ortanca (minimum- maksimum)</i>	<i>Ortanca (minimum- maksimum)</i>	<i>Ortanca (minimum- maksimum)</i>	
Yaş	49 (45-59)	47 (40-60)	48 (40-63)	45 (40-53)	0,013
VKİ (kg/m²)	32,5(23,8-38,9)	34,9(23,3-38,8)	33,3(21,30-39,5)	26,1(22,6-36,4)	<0,0001
Bel çevresi (cm)	102 (90-119)	102 (82-124)	102 (82-127)	92 (74-110)	0,002
C.k.k. Biseps(cm)	12,5 (4-32)	13,5 (5-25)	14 (2-32)	12 (3-30)	ns
C.k.k. Triseps (cm)	20,5 (8-46)	21,5 (7-40)	20,0 (2-35)	20,0 (3-35)	ns
C.k.k. Subskapülaris (cm)	25,5 (13-37)	27,5 (15-41)	30,0 (12-44)	23,0 (10-33)	ns

BGT: bozulmuş glukoz toleransı BAG: bozulmuş açlık glukozu VKİ: vücut kitle indeksi C.k.k: cilt katlantı kalınlığı ns: istatistiksel açıdan anlamsız

4.2 Osteoprotegerin sRANKL ve Karotis Intima Media Kalınlığı

Tüm çalışma popülasyonuna bakıldığında gruplar arasında osteoprotegerin ve sRANKL düzeyleri açısından anlamlı fark yoktu. Ortalama karotis intima media kalınlığı (KİMK) Tip 2 diyabet grubunda, diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı olamayacak şekilde daha fazlaydı ($p=0,08$). (Grafik 4.1) Tip 2 diyabetik grupta ortalama KİMK 0,65 cm iken BGT, BAG ve kontrol grubunda bu değer 0,60 cm idi. Ortanca osteoprotegerin değerleri tip 2 diyabetiklerde 0,964 pmol/L, BGT grubunda 0,965 pmol/L, BAG grubunda 1,074 pmol/L ve kontrollerde ise 0,99 pmol/L bulundu. sRANKL için ortanca değerler ise 0,146 pmol/L, 0,177 pmol/L, 0,149 pmol/L ve 0,144 pmol/L olarak saptandı (sırasıyla tip 2 diyabet, BGT, BAG ve kontrol grupları). (Grafik 4.2 a ve b)

Bağıntı analizi yapıldığında BAG grubunda osteoprotegerin ve ortalama KİMK arasında pozitif yönde anlamlı bağıntı olduğu görüldü ($p<0,05$ $r=0,47$) (Grafik 4.3 a). Kontrol grubunda ise sRANKL ve ortalama KİMK arasında negatif yönde bir korelasyon gözlemlendi ($p<0,05$ $r=0,45$) (Grafik 4.3 b)

Tablo 4.2 Olguların metabolik özellikleri

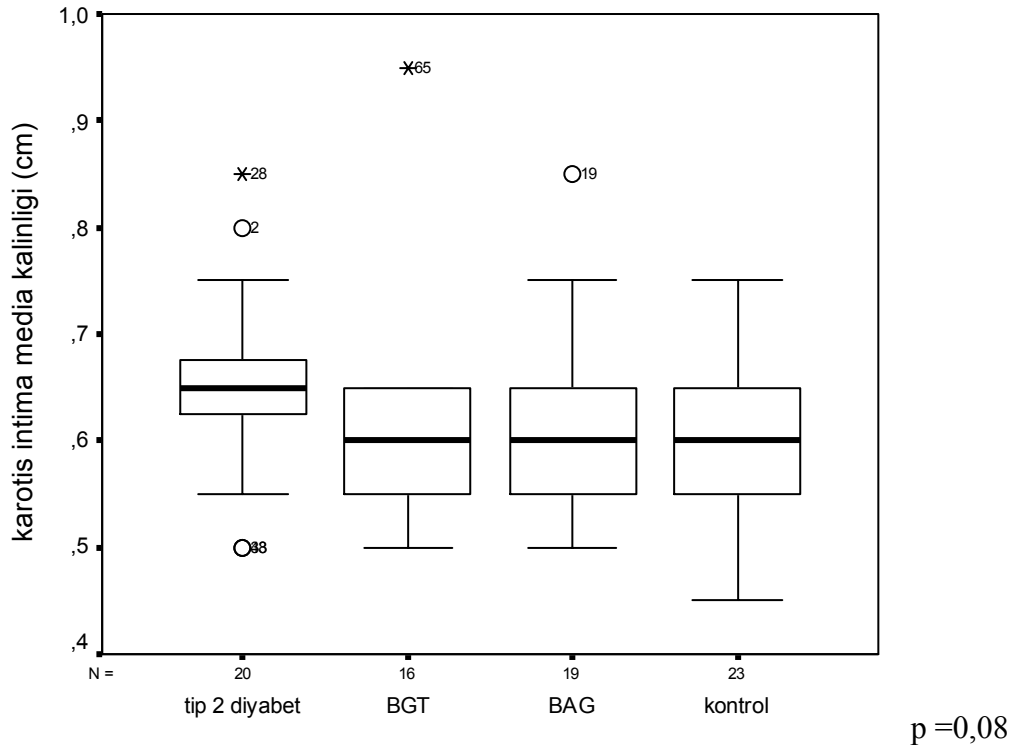
<i>Değişkenler</i>	<i>Tip 2 diyabet n=20 Ortanca (minimum- maksimum)</i>	<i>BGT n=16 Ortanca (minimum- maksimum)</i>	<i>BAG n=19 Ortanca (minimum- maksimum)</i>	<i>Kontrol n=23 Ortanca (minimum- maksimum)</i>	<i>p değeri</i>
AKŞ (mg/dl)	114 (82-257)	98 (75-139)	108 (99-124)	84 (72-99)	<0,0001
LDL (mg/dl)	104 (55-169)	127 (80-179)	112 (61-166)	114 (61-159)	ns
Trigliserit (mg/dl)	146 (62-278)	196 (55-385)	123 (57-230)	115 (20-184)	0,008
HDL (mg/dl)	46 (33-68,2)	46 (33,7-70)	47 (33-63,8)	55 (34-87)	ns
sCRP (mg/dl)	0,38 (0,0435-1,37)	0,38 (0,067-1,95)	0,32 (0,05 1,02)	0,19 (0,1-2,15)	ns
Lipo a (mg/dl)	11,8 (2-96,8)	18,7 (2-61,9)	10,7 (0,2-214)	16,9 (3,8-101)	ns
Homosistein (μmol/L)	11,6 (7,5-19,5)	11,7 (6,5-22,0)	12,5 (6,9-25,6)	11,4 (6,0-17,5)	ns
İnsulin (μIU/ml)	16,0 (7,30-43,0)	13,0 (9,60-41,0)	12,0 (4,40-24,0)	8,1 (2,90-20,0)	ns

AKŞ: açlık plazma glukozu LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein HDL: yüksek yoğunluklu lipoprotein sCRP: sensitif C reaktif protein Lipo a: lipoprotein a ns: istatistiksel açıdan anlamsız

Osteoprotegerin ve sRANKL ile diğer parametreler arasında bağıntı olup olmadığı test edildi. Buna göre:

- Tip 2 diyabetiklerde osteoprotegerin ve insulin arasında pozitif yönde ($p<0,05$ $r=0,50$)
- Bozulmuş açlık glukozu grubunda lipoprotein a ile sRANKL arasında negatif yönde ($p<0,05$ $r=0,55$)
- Sağlıklı kontrol grubunda sRANKL ile trigliserit arasında pozitif yönde ($p<0,05$ $r=0,42$) bağıntı bulundu.(Bzk Grafik 4.4 a b ve c)

Osteoprotegerin ve sRANKL düzeyleri ile LDL, açlık plazma glukozu, homosistein, sCRP arasında ise anlamlı bir korelasyon yoktu.

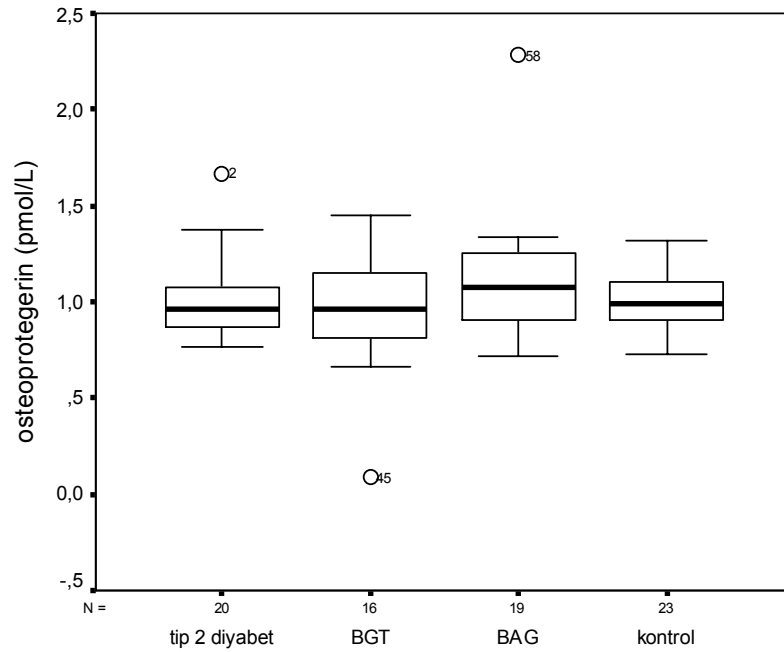


Grafik 4.1 Olguların ortalama karotis intima media kalınlıkları

Tüm çalışma popülasyonunda karotis intima media kalınlığı ile korelasyon gösteren diğer etkenler araştırıldı. Buna göre tüm çalışma popülasyonu ele alındığında kalınlık ile yaş, bel çevresi, VKİ, AKŞ, LDL, HDL, trigliserit, homosistein, insulin, hsCRP, lipoprotein a ya da üç bölgedeki cilt katlantı aklınlıkları

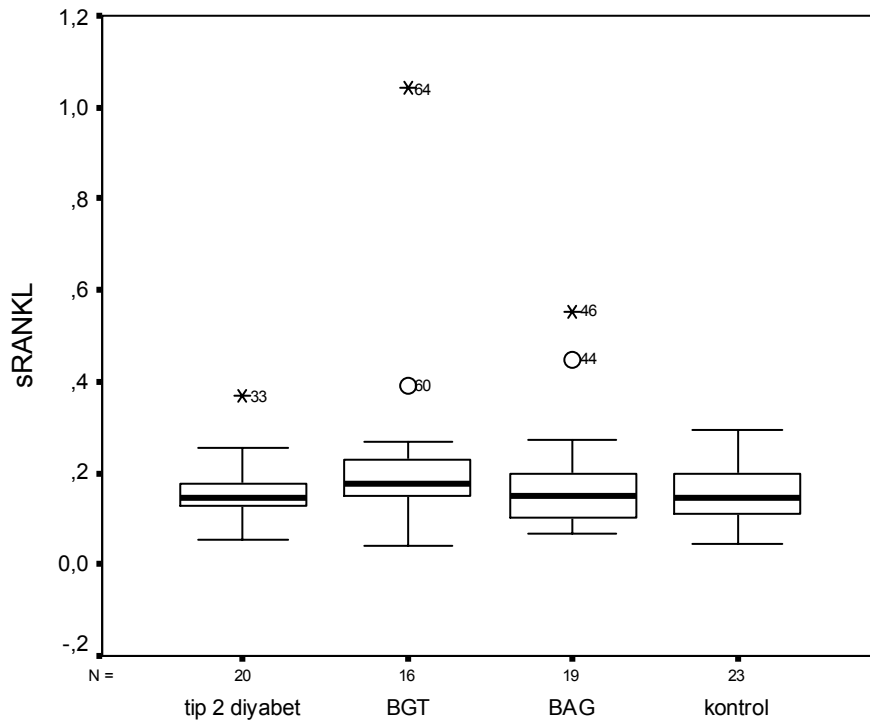
arasında istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir bağıntı bulunmadı. Aynı bağıntı çalışma grupları içinde arandığı zaman BGT grubunda KİMK ile trigliserit düzeyi ($p<0,05$ $r=0,58$) ve VKİ arasında ($p<0,05$ $r=0,51$) pozitif korelasyon bulundu

Çalışmada karotis intima media kalınlığına etki eden faktörleri değerlendirmek için çok değişkenli modeli oluşturuldu. Buna göre ünivaryans analizinde, alt gruplarda, KİMK üzerine etkisi olduğu gösterilen osteoprotegerin ve sRANKL'ın etkileri kayboldu (sırasıyla P 0,73 ve P 0,38). Ayrıca bel çevresi, trigliserit, insulin, lipoprotein a, VKİ ve sigara içiciliği de multivaryans modeline göre KİMK üzerinde anlamlı etkiye sahip değildi.

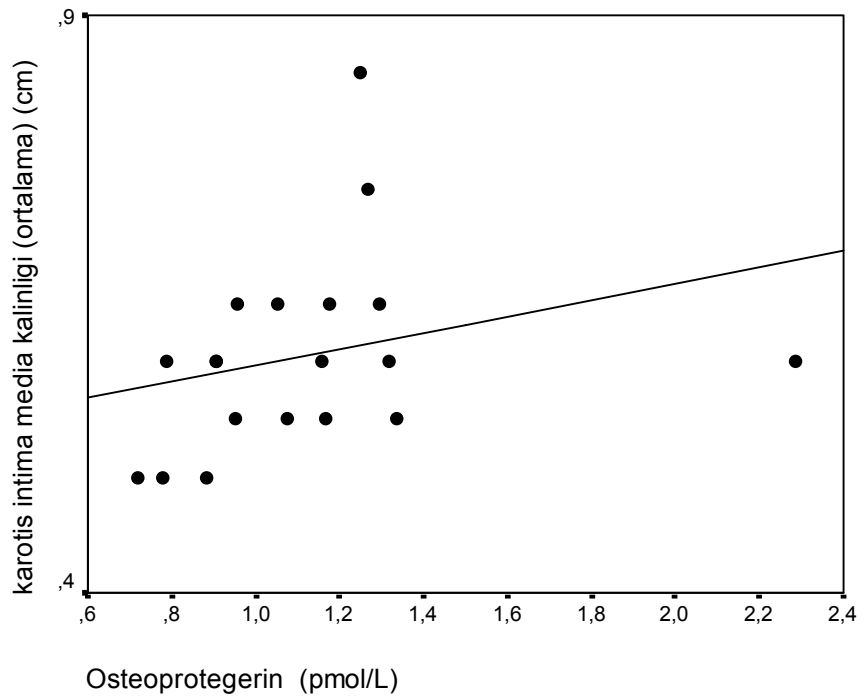


p=0,52

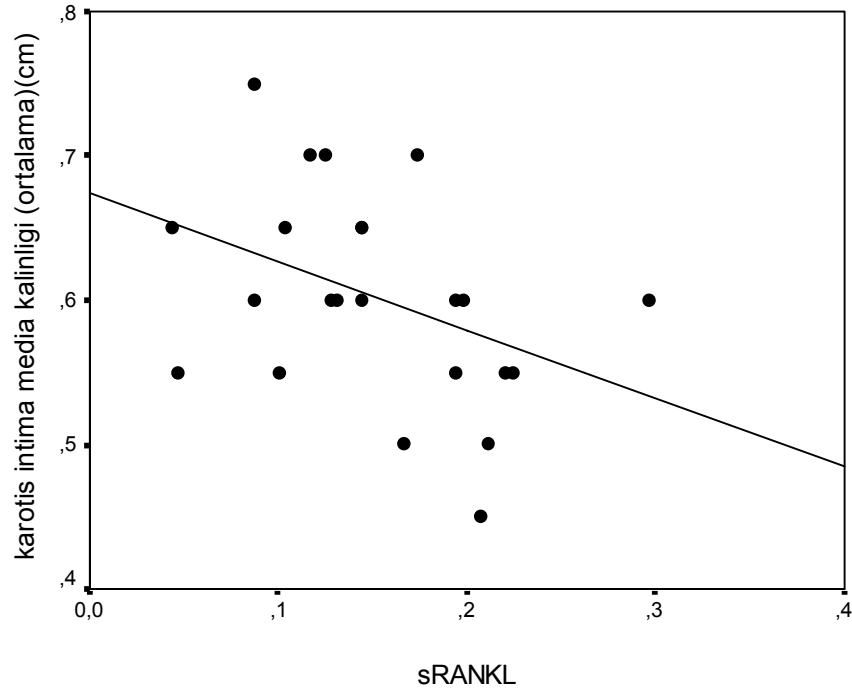
Grafik 4.2 a Gruplara göre Osteoprotegerin düzeyleri



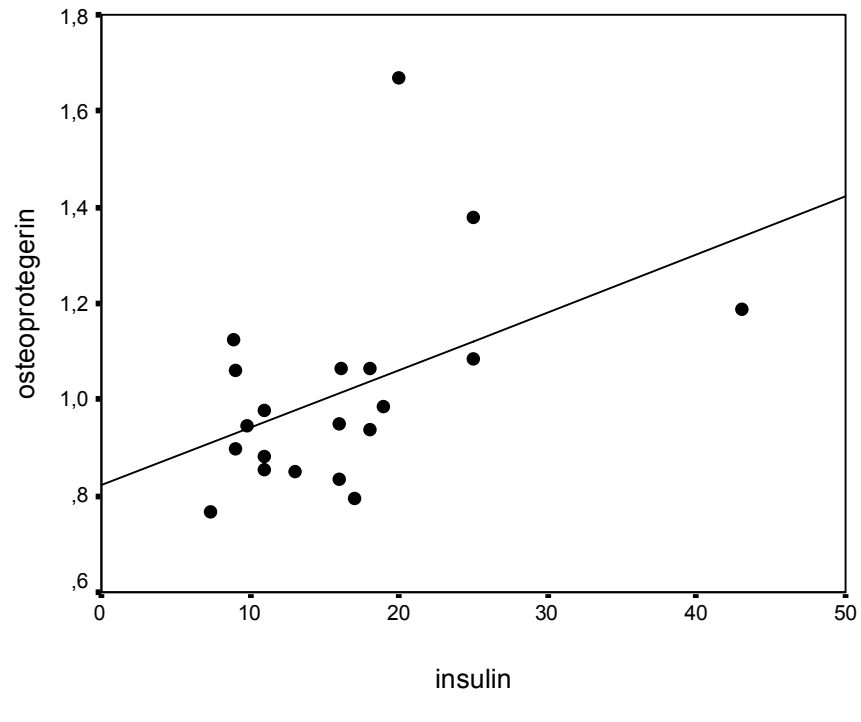
Grafik 4.2 b Gruplara göre sRANKL düzeyleri



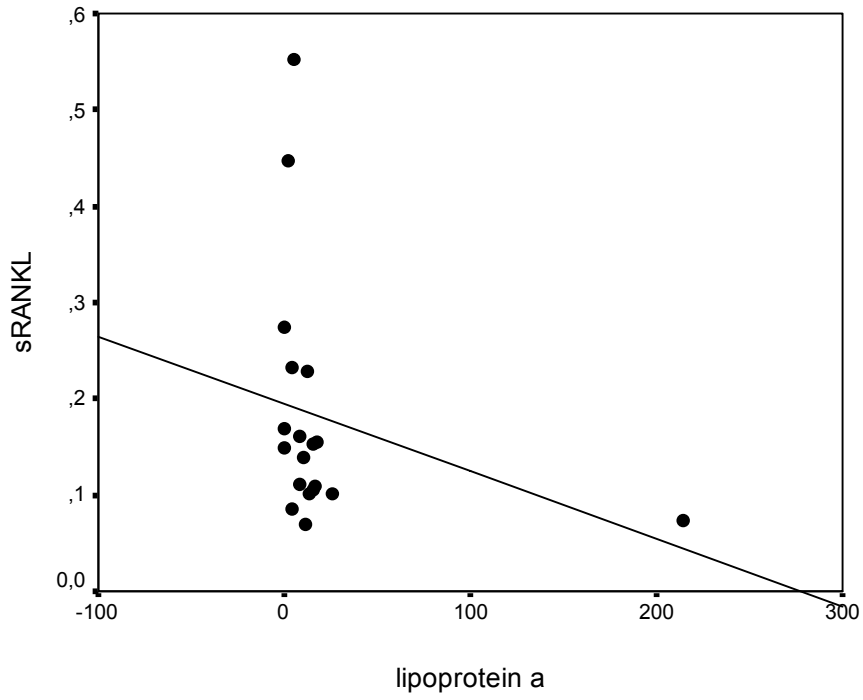
Grafik 4.3 BAG olgularında osteoprotegerin ortalama KİMK bağıntısı



Grafik 4.3 b Kontrol grubunda sRANKL ve ortalama KİMK bağıntısı

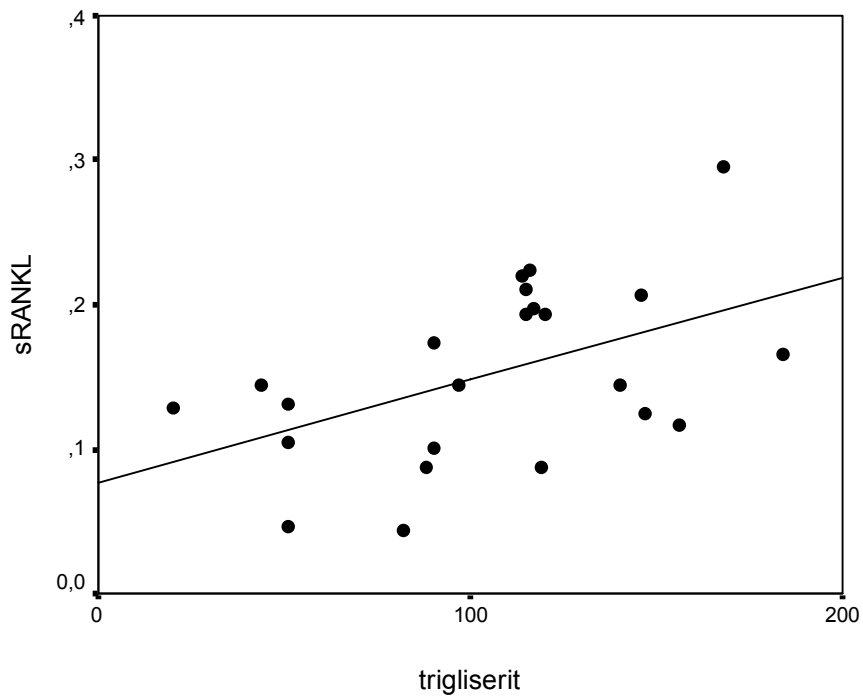


Grafik 4.4.a Tip 2 Diyabetiklerde Osteoprotegerin İnsulin Bağıntısı



$p=0,01$ $r=-0,55$

Grafik 4.4 b BAG grubunda sRANKL ve Lipoprotein a Bağıntısı



$p=0,04$ $r=0,42$

Grafik 4.4 c Sağlıklı kontrol grubunda sRANKL ve trigliserit bağıntısı

5. TARTIŞMA

5.1 Osteoprotegerin sRANKL ve Ateroskleroz

Bu kesitsel çalışmada prediyabetik ve diyabetik olgularda, karotis intima media kalınlığı ve osteoprotegerin ve sRANKL düzeyleri arasında ilişki olup olmadığına bakılmıştır. Osteoprotegerin ve sRANKL düzeyleri açısından gruplar birbirinden farklı bulunmamıştır. Karotis intima media kalınlığı açısından bakıldığında ise tip 2 diyabetiklerde KİMK, diğer gruplardan daha yüksek bulunmuştur. Gruplara göre analiz edildiğinde bozulmuş açlık glukozu grubunda osteoprotegerin ve KİMK arasında pozitif yönde bir bağıntı saptanmıştır.

Bu çalışma bilinen kardiyovasküler hastalığı ya da mikro-makrovasküler komplikasyonu olmayan bir popülasyonda, osteoprotegerin sRANKL düzeyleri ve ateroskleroz ilişkisini araştırmış olması ve prediyabetik olguları da kapsamı bakımından ilktir.

Nefropatisi olan ve olmayan tip1 diyabet hastalarının karşılaştırıldığı bir araştırmada nefropatisi olan hastalarda osteoprotegerin düzeylerinin anlamlı yüksek olduğu bulunmuş ayrıca mikroalbuminürisi olsun olmasın tüm olgular içinde, kardiyovasküler hastalığı olanlarda osteoprotegerin düzeyleri yüksek saptanmıştır (126).

Bundan başka, doğrudan koroner arter kalsifikasyonunun değerlendirildiği araştırmalar da vardır. İngiltere’de yapılan prospektif bir araştırmada hiçbir kardiyovasküler semptomu olmayan 510 tip 2 diyabetik hastada bilgisayarlı tomografi yardımıyla koroner arter kalsifikasyon (KAK) görüntülemesi yapılmış, ve hastalar ortalama 18+/-5 ay boyunca kardiyovasküler olaylar açısından izlenmiştir. Bu çalışmada; tüm olgulara bakıldığında ortalama osteoprotegerin düzeyleri 6,82 pmol/L ‘dir. KAK skoru anlamlı olarak yüksek bulunan 236 olguda osteoprotegerin düzeyleri de anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Tek değişkenli analizde KAK ile osteoprotegerin, Framingham risk skoru ve UKPDS risk skoru arasında anlamlı korelasyon varsa da çok değişkenli analizde bu anlamlılığı koruyabilen tek parametre osteoprotegerin olmuştur. Yüksek duyarlı CRP ve IL 6 ile koroner arter kalsifikasyonu arasında ise bir ilişki bulunamamıştır. İzlem boyunca 16

kardiyovasküler olay gözlenmiş ve kardiyovasküler olay geçiren olgularda osteoprotegerin düzeyleri geçirmeyenlere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla 32 pmol/L ve 6,8 pmol/L) İncelemeler, KAK ve osteoprotegerinin kısa vadede kardiyovasküler olayları öngörmede UKPDS ve Framingham risk skorundan daha doğru sonuç verdiğini göstermiştir (128).

Buradaki osteoprotegerin değerleri kendi çalışma popülasyonumuzu değerlendirmemize olanak sağlamaktadır. Bizim çalışmamızda ölçülen osteoprotegerin düzeyleri 0,96 ile 1,07 pmol/l arasında değişmektedir. osteoprotegerin düzeyi ile ateroskleroz arasında ilişki varlığını gösteren çalışmaları temel aldığımızda bizim popülasyonumuz bu ilişkiyi araştırmak için oldukça düşük değerlerde kalmaktadır. Çalışmaya bilinen kardiyovasküler hastalığı olmayan olguların alınması bu sonucu doğrulmuş olabilir. Ayrıca bizim çalışmamızdaki katılımcılardan hiçbirinde karotiste aterom plak kalsifikasyonuna rastlanmamıştır. Bu da çalışma evreninin görece erken evredeki hastalardan oluşturduğunu düşündürmektedir. BAG grubunda –karotis aterom plak kalsifikasyonu yokluğunda- osteoprotegerin ve KİMK arasında bir ilişki saptanması, osteoprotegerinin henüz saptanabilir bir kalsifikasyonun oluşmadığı aşamada dahi, ateroskleroz sürecinde etken olduğunu düşündürmektedir.

Dallas kalp çalışmasının bir analizinde 30-65 yaş arası 3386 olguda osteoprotegerin düzeyleri ölçülmüş ve bilgisayarlı tomografi ile koroner kalsifikasyon ve manyetik rezonans görüntüleme ile aorta kalsifikasyonu değerlendirilmiştir. Çoklu regresyon analizleri yapıldığında osteoprotegerinin koroner arter ve aortik plak kalsifikasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Bkz 126). Bu çalışmada ortalama osteoprotegerin düzeyi 1,209 pmol/l'dir. Çalışmada osteoprotegerin düzeyleri ile yaş CRP ve trigliserit gibi diğer kardiyovasküler risk faktörleri arasında da korelasyon saptanmıştır. Bizim çalışmamızda gruplara göre analiz yapıldığında bozulmuş açlık glukozu grubunda osteoprotegerin ve KİMK arasında pozitif yönde bir bağıntı saptanmıştır. BAG grubunda KİMK ölçümleri diğer gruplardan yüksek değildir. Diğer demografik özellikler açısından bakıldığında da bu grup diğer gruplardan istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermemiştir. Diğer gruplarda benzer bir bağıntının gösterilememesi çalışma popülasyonunun

küçük oluşu ile ve KİMK ölçümlerinin görece az duyarlı bir teknikle yapılmasıyla ilgili olabilir.

5.2 Osteoprotegerin ve Diğer Parametrelerle İlişkisi

Diyabetik hastaların sağlıklı birinci derece akrabalarında yapılan bir çalışmada 10 haftalık egzersiz programı öncesi ve sonrasında osteoprotegerin düzeyleri ölçülmüştür. Olgularda egzersiz programı sonunda osteoprotegerin düzeylerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Endotel fonksiyonu ile ilgili diğer parametrelerde (C reaktif protein, plasminojen aktivatör inhibitörü 1 çözünebilir vasküler hücre adhezyon molekülü) anlamlı bir değişim olmamıştır (129).

Tip 1 diyabetik olgularda yapılan başka bir araştırmada 22 olguda tanı anında ve 6 aylık insulin tedavisi sonrası osteoprotegerin düzeyi ölçülmüş ayrıca akım aracılı endotel bağımlı arteriyel dilatasyon ölçümleri yapılmış ve 28 sağlıklı katılımcının verileriyle karşılaştırılmıştır. osteoprotegerin düzeyleri sandviç ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. Bu çalışmaya göre; tedavi öncesi $3,09 \pm 0,70$ ng/L olan osteoprotegerin ortalaması, tedavi sonrası anlamlı düşüş göstermiştir ($2,07 \pm 0,75$ ng/L) ($p < 0,001$) Çok değişkenli analizde, bazal osteoprotegerin düzeyleri ile endotel bağımlı arteriyel dilatasyon, ultra- duyarlı CRP, açlık plazma glukozu ve HbA1C arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur. Lipoprotein a düzeylerinde ise tedavi öncesinde ve sonrasında anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Bu çalışmada sRANKL düzeylerine bakılmamıştır. Araştırmacılar bu sonuçlarla, endotel fonksiyonu ve osteoprotegerin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki olduğu yorumunu çıkarmışlardır (130). Bizim çalışmamızda, osteoprotegerin düzeyleri ile ultra-duyarlı CRP, açlık plazma glukozu arasında bir korelasyon saptanmadı.

Yüz dört tip 2 diyabetik hastada yine akım aracılı endotel bağımlı arteriyel dilatasyon ölçümleriyle endotel disfonksiyonunu değerlendirmeyi amaçlaya bir başka çalışmada, endotel disfonksiyonu olan hastalarda osteoprotegerin düzeyleri belirgin yüksek bulunmuş ayrıca osteoprotegerin düzeyleri ile albumin atılım hızı arasında korelasyon saptanmıştır. Aynı çalışmada yüksek duyarlı CRP ile endotel disfonksiyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (131).

Yeni tanı tip 2 diyabeti olan 40 olguda bazal ve 6 aylık insülin tedavisi sonrası, yüksek çözünürlüklü ultrason cihazı kullanılarak, akım aracılı endotel bağımlı arteriyel dilatasyon ölçümleri yapılmış ve 46 sağlıklı katılımcının değerleriyle karşılaştırılmıştır. Tip 2 diyabetik olgularda bazal osteoprotegerin düzeyleri sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak yüksektir ve tedavi sonrasında osteoprotegerin düzeylerinde anlamlı düşme saptanmıştır. Yine başlangıçta sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük olan akım aracılı endotel bağımlı arteriyel dilatasyon ölçümleri, tedavi sonrası iyileşme göstermiştir (132). Bu çalışmada da lipoprotein a düzeyleri tedaviyle değişmemiştir. Bizim çalışmamızda da lipoprotein a düzeyleri ile KİMK ya da osteoprotegerin veya sRANKL arasında bir ilişki bulunamadı.

Fransa'dan yapılan bir çalışmada 162 asemptomatik tip 2 diyabet hastası myokard perfüzyon sintigrafisi ile taranmış test sonucu pozitif çıkan 50 olgudan 20'sinde koroner arter hastalığı varlığı anjiyografik olarak da kanıtlanmıştır. Bu olgular, sintigrafisi negatif olan 112 olgu ile karşılaştırıldığında osteoprotegerin, Lipoprotein a, adiponektin parametrelerinden; sadece, ortancanın üzerinde osteoprotegerin değeri olan olgularda ve nefropati varlığında koroner arter hastalığı riskinin arttığı bulunmuştur (132).

Tip 2 diyabette mikrovasküler komplikasyonlarla osteoprotegerin arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada diyabetik retinopatisi olanlar, diyabetik makülopatisi olanlar, bozulmuş glukoz toleransı olanlar ve sağlıklı kontrollerden oluşan dört farklı grupta sandviç ELISA yöntemiyle osteoprotegerin düzeyleri ölçülmüştür. Diyabetik makülopatisi ve mikroalbuminüri olan bireylerde osteoprotegerin düzeyleri hem sağlıklı kontrollere hem de komplikasyonsuz diyabetiklere göre daha yüksek bulunmuştur (134).

5.3 sRANKL ve Diğer Parametrelerle İlişkisi:

Araştırmamızda iki düzeyde sRANKL ile bilinen aterosklerotik risk faktörleri arasında negatif bağıntı saptanmıştır. Bunlardan birincisi kontrol grubunda sRANKL ile KİMK arasındaki negatif yöndeki bağıntıdır. Diğeri ise BAG grubunda sRANKL ile lipoprotein a arasında yine negatif yönde saptanan bağıntıdır. Buna karşın kontrol grubunda sRANKL ile trigliserit arasında pozitif yönde bağıntı bulunmuştur. Serum sRANKL düzeyleri ile ateroskleroz ilişkisini gösteren bir çalışma yoktur. sRANKL

ile osteoprotegerin düzeyi ilişkisine bakıldığında bazı çalışmalarda osteoprotegerin arttıkça sRANKL düzeyinin azaldığı bildirilirken, bazı çalışmalarda sRANKL düzeyi ile osteoprotegerin birbiriyle ilgili bulunmamıştır.(1 11 13 29) sRANKL doku düzeyinde bakıldığında sRANKL'ın, vasküler inflamasyonu arttıran anjiyojenik sürece katkısı olduğu öne sürülmüştür (Bkz 105,107,121). Çalışmanın serum sRANKL düzeylerini temel alması ve aterosklerozla ilişkili diğer parametreler ile sRANKL arasında bir ilişki bulunmamış olması, ileri yorumlar yapmamızı engellemektedir.

Özetle; literatürde osteoprotegerin ateroskleroz ilişkisini gösteren çalışmalar ağırlıklı olarak vasküler komplikasyonu olan popülasyonlarda yapılmıştır. Bizim çalışmamızda; popülasyonun bilinen komplikasyonu olmayan bireylerden oluşturulması ve bu bireylerin kendi aralarında ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmış olması, olası bir ilişkinin maskelenmesine neden olmuş olabilir.

5.4 Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışma kesitsel bir dizayn ile yapıldığından neden sonuç ilişkisine dair yorum yapmak olası değildir.

Çalışmamıza dahil edilen bireyler, bilinen kardiyovasküler veya serebrovasküler hastalığı olmayan diyabetin makro-mikrovasküler komplikasyonlarını taşımayan kişilerdir. Ateroskleroz açısından risk altında olmalarına karşın araştırmaya konu olan ateroskleroz subklinik bir aşamada taranmıştır. Bazı çalışmalarda KİMK için eşik değer olarak tanımlanan 0,80 cm ve üstünde ölçümü olan katılımcı sayısı 78 kişi içinde sadece dördtür. Ayrıca katılımcıların hiçbirinde karotiste aterom plak kalsifikasyonu görüntülenememiştir. Bu da araştırmanın görece az riskli bir popülasyonda yapıldığını göstermektedir.

Çalışmaya alınacak kişi sayısı temin edilebilen hazır kit sayısı ile paralel olduğundan daha geniş bir popülasyonda analiz yapılamamıştır.

Ayrıca KİMK değerlerinin milimetre cinsinden verilmesi daha küçük bazı farkların gözden kaçmasına yol açmış olabilir. Daha duyarlı bir ultrasonografik ölçüm ile bu çalışmada saptanamayan bazı bağıntılar aşikar hale gelebilir.

6. SONUÇLAR - ÖNERİLER

Karotis Intima Media Kalınlığı açısından bakıldığında;

- Bilinen komplikasyonu olmayan tip 2 diyabetik hastalarda karotis intima media kalınlığı prediyabetik olgulardan ve sağlıklı kontrollerden daha yüksektir.
- Bu çalışmada LDL, hs CRP, lipoprotein a, HDL, bel çevresi veya VKİ ile KİMK arasında bağlantı bulunamamıştır.
- BAG grubunda osteoprotegerin ve ortalama KİMK arasında pozitif yönde anlamlı bağlantı saptanmıştır. Diğer gruplarda ise benzer bir bağlantıya rastlanmamıştır. Bu bağlantı karotis aterom plak yokluğunda bile osteoprotegerinin aterosklerotik süreçte rol oynadığını düşündürmektedir. Bu nedenle bu olguların gelişebilecek plak kalsifikasyonu açısından izlenmeleri uygundur.
- Kontrol grubunda ise sRANKL ve ortalama KİMK arasında negatif yönde bir korelasyon gözlenmiştir.

Osteoprotegerin ve sRANKL düzeylerinin diğer parametrelerle ilgisi incelendiğinde;

- Osteoprotegerin ve sRANKL düzeyleri ile LDL, açlık plazma glukozu, homosistein, sCRP arasında ise anlamlı bir korelasyon yoktu.
- Tip 2 diyabetiklerde osteoprotegerin ve insulin arasında pozitif yönde bir korelasyon vardır.
- Bozulmuş açlık glukozu grubunda lipoprotein a ile sRANKL negatif yönde koreledir.
- Sağlıklı kontrol grubunda sRANKL ile trigliserit arasında pozitif yönde bağlantı bulunmuştur.

Aterosklerotik kalsifikasyon ile embriyodaki osteogenezin süreç olarak benzerliği, ve osteoprotegerinin ateroskleroz ile bağlantısını gösteren prospektif ve epidemiyolojik çalışmalar, osteoprotegerin ve sRANKL'ın aterosklerozda rolü olan moleküller olduğunu kuvvetle düşündürmektedir. Bizim çalışmamız görece komplikasyonsuz ve küçük bir grupta yapıldığından bu ilişkiyi göstermekte güçsüz kalmış olabilir. Sonuç olarak osteoprotegerin ve sRANKL düzeylerinin ateroskleroz riski yüksek olan daha geniş popülasyonlarda çalışılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Skyler J. Diabetic Complications: the importance of glucose control. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996;25:243-254
2. Fox CS, Pencina MJ, Wilson PW, Paynter NP, Vasan RS, D'Agostino RB Sr. Lifetime risk of cardiovascular disease among individuals with and without diabetes stratified by obesity status in the Framingham heart study. *Diabetes Care*. 2008 Aug;31(8):1582-4.
3. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000 4;102(1):42-7.
4. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998 12;352(9131):837-53.
5. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Nelson DB, Elam MB, Schaefer EJ, Faas FH, Anderson JW. Diabetes, plasma insulin, and cardiovascular disease: subgroup analysis from the Department of Veterans Affairs high-density lipoprotein intervention trial (VA-HIT). *Arch Intern Med*. 2002 9-23;162(22):2597-604.
6. von der Recke P, Hansen MA, Hassager C. The association between low bone mass at the menopause and cardiovascular mortality. *Am J Med*. 1999;106(3):273-8
7. Towler DA. Angiogenesis and marrow stromal cell fates: roles in bone strength. *Osteoporos Int*. 2003;14 Suppl 5:S46-50;

8. Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER 3rd. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke*. 2002;33(5):1214-9
9. Mohler ER 3rd, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*. 2001 20;103(11):1522-8
10. Feldman T, Glagov S, Carroll JD. Restenosis following successful balloon valvuloplasty: bone formation in aortic valve leaflets. *Cathet Cardiovasc Diagn*. 1993;29(1):1-7.
11. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 17;93(2):165-76
12. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 18;89(2):309-19
13. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*. 1998;139(3):1329-37.
14. Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int*. 2004;74(1):103-6. Epub 2003 6. Review.

15. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 1;22(4):549-53. Review
16. Fahrleitner A, Prenner G, Leb G, Tscheliessnigg KH, Piswanger-Sölkner C, Obermayer-Pietsch B, Portugaller HR, Berghold A, Dobnig H. Serum osteoprotegerin is a major determinant of bone density development and prevalent vertebral fracture status following cardiac transplantation. *Bone.* 2003;32(1):96-106.
17. Avbersek-Luznik I, Malesic I, Rus I, Marc J. Increased levels of osteoprotegerin in hemodialysis patients. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40(10):1019-23
18. 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(2):631-7.
19. 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 11;109(18):2175-80.
20. 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 3;106(10):1192-4.
21. 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(3):1024-8.
22. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* 1993 30;329(14):977-86.

23. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *N Engl J Med.* 2000 10;342(6):381-9.
24. Haffner SM, Miettinen H. Insulin resistance implications for type II diabetes mellitus and coronary heart disease. *Am J Med.* 1997 Aug;103(2):152-62
25. Hayden JM, Reaven PD. Cardiovascular disease in diabetes mellitus type 2: a potential role for novel cardiovascular risk factors. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11(5):519-28.
26. Mykkänen L. Prevention of coronary heart disease in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl.* 2000
27. Hanefeld M, Fischer S, Julius U, Schulze J, Schwanebeck U, Schmechel H, Ziegelasch HJ, Lindner J. Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia.* 1996;39(12):1577-83
28. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe. *Lancet.* 1999 Aug 21;354(9179):617-21
29. World Health Organization. Expert Committee on Diabetes Mellitus. Second report. Geneva. WHO 1980 Technical Report Series 646
30. World Health Organization. Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis, and classification of diabetes mellitus Geneva. WHO 1999
31. de Vegt F, Dekker JM, Ruhé HG, Stehouwer CD, Nijpels G, Bouter LM, Heine RJ. Hyperglycaemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the Hoorn Study. *Diabetologia.* 1999 Aug;42(8):926-31.

32. Donahue RP, Abbott RD, Reed DM, Yano K. Postchallenge glucose concentration and coronary heart disease in men of Japanese ancestry. Honolulu Heart Program. *Diabetes*. 1987;36(6):689-92
33. Lowe LP, Liu K, Greenland P, Metzger BE, Dyer AR, Stamler J. Diabetes, asymptomatic hyperglycemia, and 22-year mortality in black and white men. The Chicago Heart Association Detection Project in Industry Study. *Diabetes Care*. 1997;20(2):163-9.
34. Shaw JE, Hodge AM, de Courten M, Chitson P, Zimmet PZ. Isolated post-challenge hyperglycaemia confirmed as a risk factor for mortality. *Diabetologia*. 1999;42(9):1050-4.
35. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care*. 1999;22(2):233-40.
36. Gaede P, Vedel P, Parving HH, Pedersen O. Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: the Steno type 2 randomised study. *Lancet*. 1999 20;353(9153):617-22
37. Hanley AJ, Williams K, Stern HP, Haffner SM. Homeostasis model assesment of IR in relaiton to the incidence of cardiovascular disease: The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 2002;25: 1117-1184
38. Chiasson JL, Gomis R, Hanefeld M, Josse RG, Karasik A, Laakso M. The STOP-NIDDM Trial: an international study on the efficacy of an alpha-glucosidase inhibitor to prevent type 2 diabetes in a population with impaired glucose tolerance: rationale, design, and preliminary screening data. Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1998;21(10):1720-5.
39. Hanefeld M. Treatment of impaired glucose tolerance with acarbose and its effect on intima-media thickness: a substudy of the STOP-NIDDM trial (study to prevent non-insulin-dependent diabetes mellitus). *Endocr Pract*. 2006 -;12 Suppl 1:56-9. Review.

40. Ginsberd HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000;106-453-458
41. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, Bonadonna RC. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation*. 2002 5;105(5):576-82
42. Balletshofer BM, Rittig K, Volk A, Maerker E, Jacob S, Rett K, Häring H. Impaired non-esterified fatty acid suppression is associated with endothelial dysfunction in insulin resistant subjects. *Horm Metab Res*. 2001;33(7):428-31.
43. King G, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996;2:255-270
44. Hsueh WA, Law RE. Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *Am J Med* 1998;105: 4S-14S
45. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*. 2000;190(3):244-54
46. Banskota NK, Taub R, Zellner K, King GL. Insulin, insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor interact additively in the induction of the protooncogene c-myc and cellular proliferation in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Mol Endocrinol*. 1989 Aug;3(8):1183-90
47. Stolar MW. Atherosclerosis in diabetes: the role of hyperinsulinemia. *Metabolism*. 1988;37(2 Suppl 1):1-9.
48. Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(4):447-57.
49. Akbari CM, Saouaf R, Barnhill DF, Newman PA, LoGerfo FW, Veves A. Endothelium-dependent vasodilatation is impaired in both microcirculation and macrocirculation during acute hyperglycemia. *J Vasc Surg*. 1998;28(4):687-94.

50. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes*. 20Jun;50(6):149
51. Gilcrease MZ, Hoover RL. Examination of monocyte adherence to endothelium under hyperglycemic conditions. *Am J Pathol*. 1991;139(5):1089-97.
52. Ceriello A, Falletti E, Motz E, Taboga C, Tonutti L, Ezsol Z, Gonano F, Bartoli E. Hyperglycemia-induced circulating ICAM-1 increase in diabetes mellitus: the possible role of oxidative stress. *Horm Metab Res*. 1998;30(3):146-9
53. Cagliero E, Roth T, Roy S, Maiello M, Lorenzi M. Expression of genes related to the extracellular matrix in human endothelial cells. Differential modulation by elevated glucose concentrations, phorbol esters, and cAMP. *J Biol Chem*. 1991 Aug 5;266(22):14244-50.
54. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest*. 2006;116(4):1071-80. Epub 2006 9.
55. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002 26;106(22):2781-6.
56. Xia P, Kramer RM, King GL. Identification of the mechanism for the inhibition of Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):733-40
57. Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autooxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autooxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*. 1995 21;34(11):3702-9

58. Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, Heath WF, Bursell S, King GL. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol.* 1993;265(5 Pt 1):E783-93.
59. Craven PA, Studer RK, DeRubertis FR. Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. Evidence for protein kinase C-mediated suppression of the cholinergic response. *J Clin Invest.* 1994;93(1):311-20
60. Pugliese G, Pricci F, Pugliese F, Mene P, Lenti L, Andreani D, Galli G, Casini A, Bianchi S, Rotella CM, et al. Mechanisms of glucose-enhanced extracellular matrix accumulation in rat glomerular mesangial cells. *Diabetes.* 1994;43(3):478-90
61. Craven PA, Studer RK, Felder J, Phillips S, DeRubertis FR Nitric oxide inhibition of transforming growth factor-beta and collagen synthesis in mesangial cells. *Diabetes.* 1997;46(4):671-81
62. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002 9;105(14):1656-62.
63. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1998 1;101(1):160-9.
64. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation.* 2002 23;106(4):466-72.

65. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994 1;269(13):9889-97
66. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 2006 10;99(10):1044-59.
67. Esper RJ, Vilariño JO, Machado RA, Paragano A Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. *Adv Cardiol.* 2008;45:17-43.
68. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr, Chow WS, Stern D, Schmidt AM. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med.* 1998;4(9):1025-31
69. Panagiotopoulos S, O'Brien RC, Bucala R, Cooper ME, Jerums G. Aminoguanidine has an anti-atherogenic effect in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis.* 1998;136(1):125-31
70. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes.* 1993;42(6):801-13.
71. Chang EY, Szallasi Z, Acs P, Raizada V, Wolfe PC, Fewtrell C, Blumberg PM, Rivera J. Functional effects of overexpression of protein kinase C- α , - β , - δ , - ϵ , and - η in the mast cell line RBL-2H3. *J Immunol.* 1997 15;159(6):2624-32
72. Kiel DP, Kauppila LI, Cupples LA, Hannan MT, O'Donnell CJ, Wilson PW. Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study. *Calcif Tissue Int.* 2001;68(5):271-6.
73. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J, de Groot LC, Hofman A, Witteman JC, van Leeuwen JP, Breteler MM, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med.* 2004 13;350(20):2033-41.

74. Mantovani A, Sozzani S, Introna M. Endothelial activation by cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 1997 15;832:93-116.
75. Cohen-Solal ME, Graulet AM, Denne MA, Gueris J, Baylink D, de Vernejoul MC. Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption: involvement of cytokines. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(6):1648-53.
76. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999 3;286(5446):1946-9
77. Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, Schlegel B, Jick H. Statin drugs and the risk of fracture *JAMA.* 2000 18;284(15):1921-2.
78. Kado DM, Browner WS, Blackwell T, Gore R, Cummings SR. Rate of bone loss is associated with mortality in older women: a prospective study. *J Bone Miner Res.* 2000;15(10):1974-80
79. Tankó LB, Christiansen C, Cox DA, Geiger MJ, McNabb MA, Cummings SR. Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2005;20(11):1912-20.
80. Samelson EJ, Kiel DP, Broe KE, Zhang Y, Cupples LA, Hannan MT, Wilson PW, Levy D, Williams SA, Vaccarino V. Metacarpal cortical area and risk of coronary heart disease: the Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 2004 15;159(6):589-95
81. van der Klift M, Pols HA, Hak AE, Witteman JC, Hofman A, de Laet CE. Bone mineral density and the risk of peripheral arterial disease: the Rotterdam Study. *Calcif Tissue Int.* 2002;70(6):443-9.
82. Mussolino ME, Madans JH, Gillum RF. Bone mineral density and mortality in women and men: the NHANES I epidemiologic follow-up study. *Ann Epidemiol.* 2003;13(10):692-7
83. Magnus JH, Broussard DL. Relationship between bone mineral density and myocardial infarction in US adults. *Osteoporos Int.* 2005;16(12):2053-62

84. Trivedi DP, Khaw KT. Bone mineral density at the hip predicts mortality in elderly men. *Osteoporos Int.* 2001;12(4):259-65
85. Marcovitz PA, Tran HH, FRANKLIN BA, O'Neill WW, Yerkey M, Boura J, Kleerekoper M, Dickinson CZ. Usefulness of bone mineral density to predict significant coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2005 15;96(8):1059-63
86. Uyama O, Yoshimoto Y, Yamamoto Y, Kawai A. Bone changes and carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Stroke.* 1997;28(9):1730-2
87. Sinnott B, Syed I, Sevruckov A, Barengolts E. Coronary calcification and osteoporosis in men and postmenopausal women are independent processes associated with aging. *Calcif Tissue Int.* 2006;78(4):195-202.
88. Aoyagi K, Ross PD, Orloff J, Davis JW, Katagiri H, Wasnich RD. Low bone density is not associated with aortic calcification. *Calcif Tissue Int.* 2001;69(1):20-4.
89. Schulz E, Arfai K, Liu X, Sayre J, Gilsanz V. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(9):4246-53
90. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunol Cell Biol.* 1999;77(2):188-93.
91. Nakagawa N, Yasuda H, Yano K, Mochizuki S, Kobayashi N, Fujimoto H, Shima N, Morinaga T, Chikazu D, Kawaguchi H, Higashio K. Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation by reciprocally regulating the production of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;265(1):158-63
92. Penno H, Silfverswärd CJ, Frost A, Brändström H, Nilsson O, Ljunggren O. Osteoprotegerin secretion from prostate cancer is stimulated by cytokines, in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 26;293(1):451-5.

93. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 30;96(7):3540-5
94. Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. *J Bone Miner Res*. 2000;15(12):2293-6.
95. Mody N, Tintut Y, Radcliff K, Demer LL. Vascular calcification and its relation to bone calcification: possible underlying mechanisms. *J Nucl Cardiol*. 2003 -;10(2):177-83.
96. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286(5):E686-96.
97. Demer LL, Tintut Y, Parhami F. Novel mechanisms in accelerated vascular calcification in renal disease patients. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11(4):437-43.
98. Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Aug;20(8):1926-31
99. Doherty TM, Uzui H, Fitzpatrick LA, Tripathi PV, Dunstan CR, Asotra K, Rajavashisth TB. Rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification. *FASEB J*. 2002;16(6):577-82
100. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(12):1998-2003

101. Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, Kuro-o M. Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest.* 1999 Aug;104(3):229-37
102. Yamashita T, Okada S, Higashio K, Nabeshima Y, Noda M. Double mutations in klotho and osteoprotegerin gene loci rescued osteopetrotic phenotype. *Endocrinology.* 2002;143(12):4711-7.
103. Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, Matsumura Y, Masuda H, Kurabayashi M, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 20;248(2):324-9.
104. Aizawa H, Saito Y, Nakamura T, Inoue M, Imanari T, Ohyama Y, Matsumura Y, Masuda H, Oba S, Mise N, Kimura K, Hasegawa A, Kurabayashi M, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R. Downregulation of the Klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Aug 28;249(3):865-71
105. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoç A, Kiliç R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Borggrefe M. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36(1):57-66.
106. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(10):1610-6.
107. 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 8;276(23):20659-72.

108. Haynes DR, Barg E, Crotti TN, Holding C, Weedon H, Atkins GJ, Zannettino A, Ahern MJ, Coleman M, Roberts-Thomson PJ, Kraan M, Tak PP, Smith MD. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(1):123-34
109. Shin V, Zebboudj AF, Boström K. Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J Vasc Res*. 2004 -;41(2):193-201
110. Fitzpatrick LA, Turner RT, Ritman ER. Endochondral bone formation in the heart: a possible mechanism of coronary calcification. *Endocrinology*. 2003;144(6):2214-9
111. Kazama JJ, Shigematsu T, Yano K, Tsuda E, Miura M, Iwasaki Y, Kawaguchi Y, Gejyo F, Kurokawa K, Fukagawa M. Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(3):525-32.
112. Brändström H, Gerdhem P, Stiger F, Obrant KJ, Melhus H, Ljunggren O, Kindmark A, Akesson K. Single nucleotide polymorphisms in the human gene for osteoprotegerin are not related to bone mineral density or fracture in elderly women. *Calcif Tissue Int*. 2004;74(1):18-24
113. Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC, Schaefer JR. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Aug;89(8):3764-8.
114. Cao J, Venton L, Sakata T, Halloran BP Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice. *J Bone Miner Res*. 2003;18(2):270-7
115. Tintut Y, Demer LL. Recent advances in multifactorial regulation of vascular calcification. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(5):555-60.
116. Sasaki N, Kusano E, Ando Y, Nemoto J, Iimura O, Ito C, Takeda S, Yano K, Tsuda E, Asano Y. Changes in osteoprotegerin and markers of bone metabolism during glucocorticoid treatment in patients with chronic glomerulonephritis. *Bone*. 2002;30(6):853-8.

117. 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 1;12(9):1260-8
118. 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 Aug 21;192(4):463-74
119. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, Mumm S. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med.* 2002 18;347(3):175-84.
120. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2003 Aug;38(4):380-7
121. Schoppet M, Al-Fakhri N, FRANK FE, Katz N, Barth PJ, Maisch B, Preissner KT, Hofbauer LC. 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 Aug;89(8):4104-12
122. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res.* 2003 Aug;18(8):1404-18
123. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Sturn DH, Wiedermann CJ. Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(7):2309-16.

124. Hofbauer LC, Schoppet M, Schüller P, Viereck V, Christ M. Effects of oral contraceptives on circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand serum levels in healthy young women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;60(2):214-9.
125. Kim HH, Shin HS, Kwak HJ, Ahn KY, Kim JH, Lee HJ, Lee MS, Lee ZH, Koh GY. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J*. 2003;17(14):2163-5. Epub 2003 18
126. Abedin M, Omland T, Ueland T, Khera A, Aukrust P, Murphy SA, Jain T, Gruntmanis U, McGuire DK, de Lemos JA. Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas Heart Study). *Am J Cardiol*. 2007 15;99(4):513-8.
127. Rasmussen LM, Tarnow L, Hansen TK, Parving HH, Flyvbjerg A. Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status, systolic blood pressure, kidney function and cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients. *Eur J Endocrinol*. 2006; 154(1):75-81
128. Anand DV, Lahiri A, Lim E, Hopkins D, Corder R. The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coronary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2006 2;47(9):18
129. Ostergård T, Nyholm B, Hansen TK, Rasmussen LM, Ingerslev J, Sørensen KE, Bøtker HE, Saltin B, Schmitz O. Endothelial function and biochemical vascular markers in first-degree relatives of type 2 diabetic patients: the effect of exercise training. *Metabolism*. 2006;55(11):1508-15.
130. Xiang GD, Sun HL, Zhao LS. Changes of osteoprotegerin before and after insulin therapy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76(2):199-206
131. Shin JY, Shin YG, Chung CH. Elevated serum osteoprotegerin levels are associated with vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(7):1664-6.

132. Xiang GD, Xu L, Zhao LS, Yue L, Hou J. The relationship between plasma osteoprotegerin and endothelium-dependent arterial dilation in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006;55(7):2126-31
133. Avignon A, Sultan A, Piot C, Elaerts S, Cristol JP, Dupuy AM. Osteoprotegerin is associated with silent coronary artery disease in high-risk but asymptomatic type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2005;28(9):2176-80.
134. Knudsen ST, Foss CH, Poulsen PL, Andersen NH, Mogensen CE, Rasmussen LM. Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microvascular complications. *Eur J Endocrinol*. 2003;149(1):39-42