

Significato fisiopatologico e utilizzo clinico dell'osteoprotegerina circolante

Andrea Dovio, Valeria Data, Alberto Angeli

Osteoprotegerin (OPG) belongs to the tumor necrosis factor receptor superfamily and acts as a decoy receptor for the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), preventing its binding to RANK. Since 1997, the RANKL/RANK/OPG system has been intensively investigated in the fields of bone, immune and cardiovascular system pathophysiology. Specific anti-OPG antibodies have been developed, allowing for the measurement of OPG and, more recently, of soluble RANKL in both physiological and pathological conditions, often yielding unexpected results. When considering circulating OPG measurements, it should be borne in mind that this receptor is ubiquitously expressed, and that circulating levels do reflect the production by a number of tissues. Moreover, strikingly different values of circulating OPG have been reported.

The aim of this paper is to summarize the available data on circulating OPG levels in a number of conditions; the pathophysiological significance and potential clinical utility will be emphasized. (Ann Ital Med Int 2004; 19: 8-19)

Key words: Atherosclerosis; Bone metabolic disorders; Bone metastases; Immune system; Osteoprotegerin; RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand).

Introduzione

L'osteoprotegerina (OPG), una glicoproteina appartenente alla "superfamiglia" dei recettori del fattore di necrosi tumorale (TNF), agisce come "falso" recettore di RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*), impedendone l'interazione con il recettore cellulare RANK.

RANKL/RANK/OPG rappresentano una triade citochinica che dal 1997 è oggetto di un'intensa attività di ricerca nell'ambito della fisiopatologia del metabolismo osseo, del sistema immunitario e dell'apparato cardiovascolare. La disponibilità di anticorpi specifici ha reso possibile il dosaggio prima dell'OPG e poi della forma solubile di RANKL (sRANKL) in condizioni fisiologiche e patologiche, con risultati spesso inattesi. La grande maggioranza degli studi si è concentrata sul ruolo chiave svolto da questo sistema nella modulazione del riassorbimento osseo, la cui comprensione ha aperto la strada agli studi farmacologici; e già sono stati conclusi, con risultati incoraggianti, i primi trial clinici che utilizzano a scopo terapeutico forme ricombinanti di OPG e di RANK.

La letteratura concernente il sistema citochinico RANKL/RANK/OPG è ormai vastissima, ed è stata oggetto di recenti, accurate rassegne. Lo scopo del presente lavoro è offrire una sintesi dei dati disponibili concernenti i livelli sierici di OPG in svariate condizioni, con particolare attenzione per i loro significati fisiopatologici e, quando pre-

senti, clinici. La disamina della letteratura sarà preceduta da una breve presentazione del sistema citochinico e delle problematiche metodologiche del dosaggio.

Il sistema RANKL/RANK/OPG

RANKL è una proteina transmembrana o solubile, prodotta dalle cellule della linea stromale-osteoblastica e dai linfociti T attivati, che lega il recettore cellulare RANK, espresso dagli osteoclasti e dai loro precursori, e dalle cellule dendritiche. L'OPG è una molecola solubile, anch'essa prodotta dalle cellule della linea stromale-osteoblastica e dai linfociti T attivati, che agisce come "falso" recettore di RANKL, impedendo cioè l'interazione di RANKL con RANK (Fig. 1).

Nel microambiente osseo il legame di RANKL con RANK stimola la differenziazione, la fusione, l'attivazione e la sopravvivenza degli osteoclasti, con un conseguente aumento del riassorbimento osseo. OPG, impedendo tale legame, sortisce effetti opposti (Fig. 2). Il bilancio tra RANKL ed OPG rappresenta il principale determinante del numero e dell'attività osteoclastica, e la via finale comune alla maggior parte dei fattori modulanti il riassorbimento osseo. L'espressione di RANKL ed OPG da parte di cellule stromali-osteoblastiche è sottoposta ad una complessa modulazione endocrina ed autocrino-paracrina, che coinvolge tutti i principali ormoni e mediatori locali osteotropi; è inoltre bersaglio di numerosi farmaci, tra cui immunosoppressori e bisfosfonati. Meno nota, e forse meno significativa, è la modulazione dell'espressione di RANK.

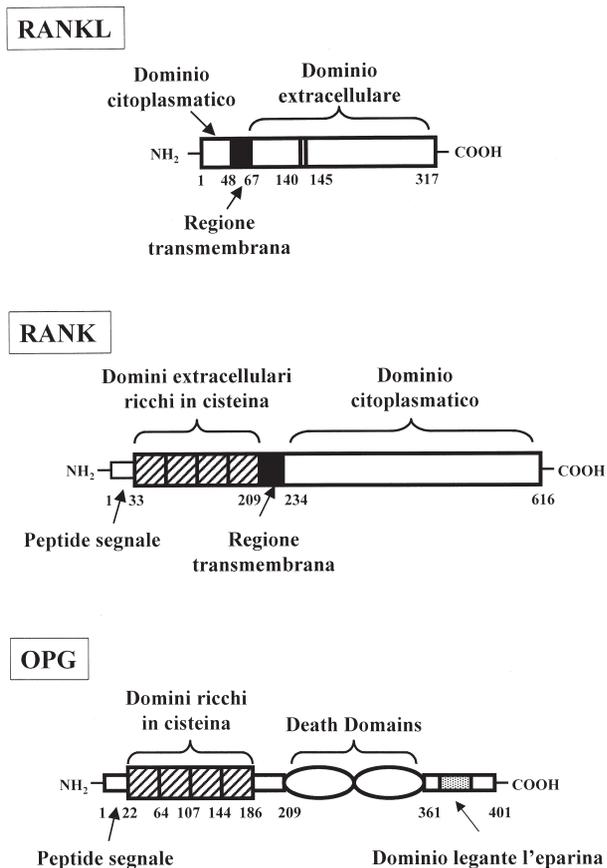


FIGURA 1. Rappresentazione schematica dei domini funzionali del sistema receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/receptor activator of nuclear factor- κ B/osteoprotegerina (RANKL/RANK/OPG). RANKL esiste in quattro diverse isoforme. Processi di splicing alternativo danno origine a due forme transmembrana di tipo II (317, illustrata in figura, o 270 aminoacidi) e una forma solubile di 243 aminoacidi. L'altra isoforma solubile deriva dal clivaggio proteolitico ad opera di metalloproteasi. RANK è una glicoproteina transmembrana di tipo I. Nel dominio extracellulare sono presenti quattro motivi ricchi in cisteina, che legano RANKL. OPG è una glicoproteina solubile, che contiene quattro motivi ricchi in cisteina mediante i quali lega RANKL, due "death domains" e un dominio legante l'eparina. Una forma di membrana è stata descritta su una linea di cellule follicolari dendritiche.

Nel contesto del sistema immunitario, l'interazione RANKL-RANK promuove la sopravvivenza e la capacità immunostimolatoria delle cellule dendritiche, e quindi la proliferazione dei linfociti T. A livello vascolare, infine, l'OPG è in grado di inibire l'apoptosi delle cellule endoteliali. Il meccanismo responsabile di tale effetto non è ancora stato chiarito, ma probabilmente è implicato il TNF-related apoptosis-inducing ligand, un altro ligando dell'OPG, anch'esso appartenente alla "superfamiglia" del TNF. L'OPG è in grado di bloccare il segnale pro-apop-

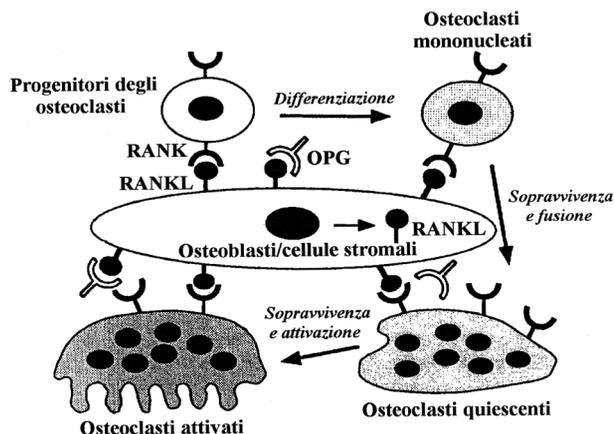


FIGURA 2. Meccanismo d'azione del sistema receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/receptor activator of nuclear factor- κ B/osteoprotegerina (RANKL/RANK/OPG) nel microambiente osseo. L'interazione RANKL-RANK induce la differenziazione, la fusione dei precursori, e l'attivazione e la sopravvivenza degli osteoclasti maturi. L'OPG, inibendo tale interazione, sortisce effetti opposti. In condizioni fisiologiche la fonte principale di RANKL è verosimilmente costituita dalle cellule della linea stromale-osteoblastica. In condizioni patologiche assumono un ruolo importante nella produzione di RANKL i linfociti T attivati, i sinoviociti e le cellule neoplastiche.

totico mediato dal TNF-related apoptosis-inducing ligand.

Lo studio dei topi *knock-out* per le diverse componenti del sistema ne ha confermato il ruolo chiave a livello osseo, del sistema immunitario e dell'apparato cardiovascolare: i topi *knock-out* per RANKL e quelli *knock-out* per RANK hanno un fenotipo simile, caratterizzato da osteopetrosi con completa assenza di osteoclasti e mancanza di linfonodi con anomalo sviluppo dei linfociti B e T, mentre i topi *knock-out* per OPG manifestano grave osteoporosi da aumentata osteoclastogenesi e sviluppano calcificazioni delle pareti arteriose dell'aorta e delle arterie renali.

Per un approfondimento della biologia del sistema RANKL/RANK/OPG si rinvia alle recenti rassegne pubblicate¹⁻⁸.

Il dosaggio dell'osteoprotegerina sierica: considerazioni metodologiche

Osteoprotegerina

Nel considerare i risultati ottenuti con il dosaggio dell'OPG sierica, occorre anzitutto ricordare che essendo la sua espressione pressoché ubiquitaria, e non essendo stata riportata l'esistenza di isoforme diverse, "tessuto-specifiche", i livelli circolanti rispecchiano la produzione da parte di numerosi tessuti, il cui contributo relativo non è noto.

In secondo luogo, emerge una spiccata discrepanza nei valori assoluti di OPG circolante riportati, esemplificata dalla tabella I⁹⁻¹⁴, in cui sono esposti i diversi livelli sierici di OPG misurati nei soggetti sani utilizzati come controlli in alcuni studi su pazienti oncologici ed endocrinologici.

Le discrepanze osservate sono riconducibili anzitutto alla diversità dei reagenti utilizzati. L'OPG è attualmente dosata con metodica enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), utilizzando come elemento di cattura o un anticorpo monoclonale anti-OPG, o RANKL ricombinante, mentre l'elemento di rilevamento è un anticorpo (mono o policlonale) anti-OPG¹⁵. È stato inoltre descritto un metodo di immuno-reazione polimerasica a catena specifico per la forma omodimerica. L'OPG circolante è infatti presente in forma monomeric (> 90% in condizioni fisiologiche) ed in forma omodimerica (< 10%); quest'ultima sembra essere la forma più attiva¹⁶. Le metodiche a tutt'oggi disponibili in commercio utilizzano diverse coppie di anticorpi anti-OPG. È ovvio che diverse coppie di anticorpi diretti verso differenti epitopi possono essere responsabili dei diversi valori misurati; in particolare, l'OPG circolante, oltre che in forma mono- ed omodimerica, può essere sia libera, sia legata a sRANKL; la specificità delle coppie di anticorpi per le diverse forme non è a tutt'oggi completamente definita. Tuttavia, è interessante notare come risultati grandemente differenti (fino a tre ordini di grandezza) siano stati ottenuti anche da autori che utilizzano verosimilmente la stessa coppia di anticorpi. Quest'ultima osservazione richiama l'importanza di una serie di variabili analitiche e pre-analitiche; tra le prime, ricordiamo in particolare la proteina ed il diluente utilizzati per la preparazione degli standard¹⁷. Per quanto concerne le seconde, è dimostrata l'importanza della tipologia del campione, in quanto livelli superiori sono misurati nel siero rispetto a quelli riscontrati nel plasma¹³.

È stato inoltre dimostrato che la conservazione del campione non separato a temperatura ambiente comporta un aumento significativo dei livelli successivamente misurati nel siero; tale aumento può essere prevenuto mediante refrigerazione del campione¹⁸. Altri fattori, quali l'influsso dell'alimentazione rispetto allo stato di digiuno e l'eventuale esistenza di una variabilità ritmica, non sono stati a tutt'oggi indagati.

Resta dunque aperto il problema dei valori assoluti, "reali" dell'OPG circolante. Non è attualmente possibile escludere che metodiche diverse rilevino forme diverse della molecola, potenzialmente dotate di specifiche attività biologiche e significato fisiopatologico. Allo stato attuale delle conoscenze, lo studio dell'OPG sierica è quindi possibile attraverso il confronto tra popolazioni di soggetti opportunamente selezionati ed il rigoroso controllo delle condizioni di prelievo e delle metodiche di dosaggio.

Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand solubile

La forma solubile di RANKL può derivare o da *splicing* alternativo di un comune pre-RNA, o da clivaggio proteolitico della forma di membrana ad opera di metalloproteasi, tra cui l'enzima di conversione del TNF- α . La forma di membrana ha, almeno in modelli murini, una maggiore attività biologica rispetto a quella solubile¹⁹. I livelli circolanti di sRANKL sono attualmente dosati con metodica ELISA, utilizzando come elemento di cattura OPG e come elemento di rilevamento un anticorpo anti-RANKL. In conseguenza dell'utilizzo di OPG come elemento di cattura, gli ELISA attualmente disponibili misurano solo la quota libera di sRANKL, ovvero quella non complessata con OPG, e la sensibilità della metodica è condizionata dalla concentrazione di OPG del campione. In effetti, è stato suggerito che le differenze nei livelli circolanti di sRANKL in alcune patologie possano semplicemente riflettere le differenze nei valori di OPG^{20,21}. Del tutto re-

TABELLA I. Livelli sierici di osteoprotegerina (OPG) in alcune popolazioni di soggetti sani.

Autore	N. controlli	Età (anni)	Sesso (M/F)	OPG (pg/mL)	ELISA
Seidel et al. ⁹ , 2001	40	nr*	nr*	9000 (5100-130 000) [†]	R&D Systems
Jung et al. ¹⁰ , 2001	36	51.4 [‡]	36/0	33.9 \pm 15.9	Immundiagnostik-Biomedica
Brown et al. ¹¹ , 2001	6	32 (23-50)	6/0	22.39 (15.95-57.47) [§]	R&D Systems
Ueland et al. ¹² , 2001	59	44 (23-66)	30/29	~800	R&D Systems
Lipton et al. ¹³ , 2002	112	40 \pm 13.6	40/72	~170	Amgen
Terpos et al. ¹⁴ , 2003	45	61.5 (34-79)	nr	159.6 (155.4-170.8)	Immundiagnostik-Biomedica

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard o mediana (range).

nr = non riportato.

* appaiati per sesso ed età con un gruppo di 225 soggetti con mieloma multiplo (età media 66.6 \pm 9.3 anni); [†] i campioni sono stati diluiti; [‡] media; [§] i risultati sono confermati da un secondo dosaggio ELISA in cui l'elemento di cattura usato è il receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; ^{||} la mediana è stata dedotta dalla figura 1.

centemente è stata messa a punto una metodica per il dosaggio di sRANKL totale (libero e complessato) (Immundiagnostik, <http://www.immundiagnostik.com>, ultimo accesso 11 luglio 2003). Pochi studi hanno valutato i livelli sierici di sRANKL (Tab. II)^{20,22-28}; nei soggetti sani essi risultano spesso indosabili.

Studi clinici

Popolazione sana

Diversi studi clinici (il più recente e più vasto condotto in Austria su 1134 soggetti sani da Kudlacek et al.²⁹) hanno valutato i livelli circolanti di OPG in popolazioni di soggetti sani adulti. Dal confronto emerge anzitutto l'esistenza di una correlazione positiva tra OPG circolante ed età, tanto negli uomini quanto nelle donne³⁰⁻³⁸. Il recente dato negativo di Rogers et al.³⁹ è verosimilmente dovuto al ristretto intervallo di età della popolazione in studio (56-91 anni), ed alla maggiore variabilità dei valori circolanti nella popolazione anziana^{29,30,36}. L'aumento con l'età può

riflettere un incremento della produzione di OPG nel corso di processi patologici quali osteoporosi ed aterosclerosi, come pure una ridotta clearance renale.

Dallo studio di Khosla et al.³⁶ emerge inoltre che le donne in età fertile hanno livelli di OPG superiori a quelli di uomini di pari età, ma questa differenza si perde nella postmenopausa; tale differenza non è però stata riportata da altri gruppi. L'interesse per il ruolo degli ormoni sessuali nella regolazione dei livelli circolanti di OPG è stato alimentato da studi *in vitro* che hanno dimostrato che gli estrogeni stimolano, mentre gli androgeni inibiscono l'espressione osteoblastica di OPG⁴⁰⁻⁴². I risultati degli studi clinici sono però contrastanti (Tab. III)^{29,32,35,36,39,43}. In popolazioni di donne sane Khosla et al.³⁶ non hanno rilevato alcuna correlazione tra OPG ed ormoni sessuali, mentre Kudlacek et al.²⁹ e Indridason et al.³² hanno riportato una correlazione negativa tra OPG ed estradiolo; in donne in postmenopausa è emersa, invece, una correlazione positiva con estradiolo^{31,39,43} ed estrone⁴³. Nell'uomo Szulc et al.³⁵ hanno riscontrato una correlazione po-

TABELLA II. Livelli sierici di receptor activator of nuclear factor-κB ligand solubile (sRANKL).

Autore	Popolazione in studio	Patologia	Livelli di sRANKL	Osservazioni
White et al. ²⁰ , 2002	1 paziente di 1 anno	Morbo di Paget giovanile	↑ rispetto ai controlli	
Nuti et al. ²² , 2002	14 maschi (range 47-88 anni) e 16 femmine (range 60-90 anni)	Morbo di Paget dell'osso	↓ rispetto ai controlli (donne osteoporotiche)	
Alvarez et al. ²³ , 2003	18 maschi e 13 femmine in postmenopausa (età media 62.7 ± 2 anni, range 42-86 anni)	Morbo di Paget dell'osso	Nessuna differenza rispetto ai controlli	Indosabile in 16/31 pazienti e in 18/39 controlli
Ziolkowska et al. ²⁴ , 2002	8 maschi e 35 femmine (età media 51.2 ± 2.1 anni, range 25-78 anni)	AR	↑ rispetto ai controlli	
Geusens et al. ²⁵ , 2002	119*	AR iniziale attiva	Pazienti con FR positivo > pazienti FR negativi	↘ f-BMD, ↗↗ uCTX-I/creatinina, uCTX-II/creatinina, PCR, VES e DAS ↔ danno radiografico, l-BMD
Schoppet et al. ²⁶ , 2002	346 maschi (età media 59.7 ± 8.8 anni)	Coronaropatia	↓ rispetto ai soggetti senza coronaropatia	
Hegedus et al. ²⁷ , 2002	12 maschi e 9 femmine (età media 30.8 anni, range 14-46 anni)	Malattia di Wilson	Nessuna differenza rispetto ai controlli	Indosabile in 15/21 pazienti e in 14/20 controlli
Szalay et al. ²⁸ , 2003	41 femmine (età media 57.1 anni, range 39-75 anni) 16 femmine (età media 56.5 anni, range 43-83 anni)	CBP Epatite C cronica	↓ rispetto ai controlli sani ↑ rispetto ai controlli sani e ai pazienti con CBP	Indosabile in 21/41 pazienti ↘ ALP

ALP = fosfatasi alcalina; AR = artrite reumatoide; CBP = cirrosi biliare primitiva; DAS = disease activity score; f-BMD = densità minerale ossea femorale; FR = fattore reumatoide; l-BMD = densità minerale ossea lombare; PCR = proteina C reattiva; uCTX-I = telopeptide C-terminale del collagene di tipo I urinario; uCTX-II = telopeptide C-terminale del collagene di tipo II urinario; VES = velocità di eritrosedimentazione; ↑ = aumentato; ↓ = diminuito; ↗↗ = correlazione positiva; ↘ = correlazione negativa; ↔ = nessuna correlazione.

* la composizione maschi/femmine e l'età media non è desumibile dall'abstract.

TABELLA III. Correlazioni tra osteoprotegerina (OPG) e ormoni sessuali.

Autore	Popolazione in studio	Correlazioni ormoni sessuali e OPG
Arrighi et al. ⁴³ , 2000	160 femmine in postmenopausa	↗↗ E ₁ ed E ₂
Indridason et al. ³² , 2002	209 maschi e 247 femmine (range 40-85 anni)	Maschi: ↗↗ SHBG Femmine: ↘↘ E ₂
Szulc et al. ³⁵ , 2001	252 maschi (età media 56 ± 18 anni)	> 40 anni: ↗↗ FTI e FEI ↔ T totale e libero, E ₂ e androstenedione
Khosla et al. ³⁶ , 2002	346 maschi (range 23-90 anni) e 304 femmine (range 21-93 anni)	Maschi > 50 anni: ↘↘ T totale e libero Maschi: ↘↘ E ₂ libero Femmine: ↔
Rogers et al. ³⁹ , 2002	180 femmine in postmenopausa (età mediana 66 anni, range 56-91 anni)	↗↗ E ₂
Kudlacek et al. ²⁹ , 2003	447 maschi (età media 52 ± 13.5 anni, range 24-96 anni) e 687 femmine (età media 50 ± 21 anni, range 19-94 anni)	Maschi: ↗↗ T Femmine: ↘↘ E ₂

E₁ = estrone; E₂ = estradiolo; FEI = free 17β-estradiol index; FTI = free testosterone index; SHBG = sex hormone binding globulin; T = testosterone; ↗↗ = correlazione positiva; ↘↘ = correlazione negativa; ↔ = nessuna correlazione.

sitiva tra indici di testosterone ed estradiolo liberi ed OPG nei soggetti > 40 anni, nessuna correlazione invece con il testosterone, l'estradiolo e l'androstenedione. Al contrario, Khosla et al.³⁶ hanno riportato una correlazione negativa tra estrogeni (estradiolo libero) ed androgeni (testosterone totale e libero), da una parte, ed OPG, dall'altra. Infine, Kudlacek et al.²⁹ hanno osservato una correlazione positiva con il testosterone.

La conflittualità dei dati può essere certo imputata alla diversità nelle metodiche analitiche (dosaggio dell'OPG e degli steroidi sessuali); tuttavia è importante sottolineare la debolezza delle correlazioni riportate negli studi. È verosimile che azioni diversificate degli ormoni sessuali nei differenti tessuti che esprimono OPG ne rendano non univoci gli effetti sui livelli circolanti.

Osteopatie metaboliche

In considerazione del ruolo chiave del sistema RANKL/RANK/OPG nella regolazione dell'osteoclastogenesi, i primi studi hanno ricercato la presenza di correlazioni tra livelli sierici di OPG ed il metabolismo osseo, studiato attraverso tecniche densitometriche e marcatori di turnover.

I primi risultati, riportati da Yano et al.³⁰, sono apparsi paradossali: i livelli sierici di OPG risultavano infatti superiori nelle donne osteoporotiche rispetto ad una popolazione di donne di pari età non osteoporotiche; nel gruppo delle pazienti osteoporotiche erano inoltre superiori in quelle con anamnesi positiva per fratture vertebrali non traumatiche rispetto a quelle senza fratture. Coerentemente con questi primi risultati, alcuni studi hanno riportato

nelle donne in postmenopausa una correlazione inversa tra livelli di OPG e densità minerale ossea (BMD) in diversi siti^{30,34,43}; altri, invece, non hanno riscontrato correlazioni tra OPG e BMD^{36,38}. Anche negli uomini è stata riportata o nessuna correlazione^{29,35}, o una debole correlazione inversa^{32,36}. Il riscontro di una correlazione inversa è stato concordemente interpretato come espressione di un meccanismo compensatorio inadeguato, e non ha impedito la realizzazione di un trial clinico in cui la somministrazione sottocutanea di OPG (dose massima 3 mg/kg) in donne in postmenopausa ha determinato una rapida, significativa e prolungata riduzione del riassorbimento osseo⁴⁴.

Anche i risultati sull'esistenza di correlazioni tra livelli di OPG e svariati marcatori del metabolismo osseo sono contrastanti, dipendendo dal sesso e dall'età della popolazione in studio, nonché dall'analita considerato; sono riassunti nella tabella IV^{29,30,32,34-39,43}. L'ipotesi dell'"aumento compensatorio" è stata invocata per spiegare il frequente riscontro di una correlazione positiva tra livelli circolanti di OPG e marcatori di riassorbimento.

La discrepanza dei risultati concernenti le correlazioni tra livelli circolanti di OPG, BMD e marcatori di turnover può essere dovuta alla diversità delle popolazioni in studio e delle metodiche di dosaggio; ma richiama anche la molteplicità delle sorgenti tissutali dell'OPG circolante. L'osteoporosi è una condizione caratteristica dell'età avanzata, nella quale la compresenza di altre patologie (*in primis* l'aterosclerosi) può contribuire a modificare i livelli di OPG, aumentandone la variabilità e mascherandone la "quota ossea".

TABELLA IV. Correlazioni tra osteoprotetgerina (OPG), densità minerale ossea (BMD) e marcatori del metabolismo osseo.

Autore	Popolazione in studio	Sedi valutate	Correlazioni BMD e OPG	Correlazioni marcatori ossei e OPG	Metodica di dosaggio OPG
Yano et al. ³⁰ , 1999	Femmine in postmenopausa: 73 osteoporotiche (età media 68.2 ± 7.7 anni), 39 osteopeniche (età media 66.6 ± 9.2 anni) e 38 controllati sani (età media 67.1 ± 8.6 anni)	Colonna, total body	↗↘ l-BMD e tb-BMD	Osteoporotiche: ↗↗ ALP ossea, uPyr, uDpyr Controlli: ↗↗ ALP ossea, uPyr, uDpyr e BGP	In house
Arrighi et al. ⁴³ , 2000	160 femmine in postmenopausa	nr	↗↘ fn-BMD	-	nr
Szulec et al. ³⁵ , 2001	252 maschi (età media 56 ± 18 anni)	Colonna, femore, total body, radio*	↔↔	> 40 anni: ↗↘ uDpyr (totale e libera), PTH ↔↔ BGP, ALP ossea, PINP e 25OHvitD	Immundiagnostik
Browner et al. ³⁸ , 2001	490 femmine (≥ 65 anni)	Radio*, calcagno*, colonna, femore	↔↔	↗↘ BGP ↗↗ sCa, PTH	Amgen
Indridason et al. ³² , 2002	209 maschi e 247 femmine (range 40-85 anni)	nr	Maschi: ↗↘ BMD Femmine: ↗↘ BMD	Maschi: ↗↗ ALP, TRAP, sCa e PTH Femmine: ↗↗ ALP, BGP, collagen crosslaps e PTH	Immundiagnostik- Biomedica
Scarano et al. ³⁴ , 2002	84 femmine in postmenopausa (età media 78 anni, range 61-97 anni)	nr	↗↘ fn-BMD e tb-BMD	↗↗ PTH, ICTP, sNTX	nr
Khosla et al. ³⁶ , 2002	346 maschi (range 23-90 anni) e 304 femmine (range 21-93 anni)	Colonna, collo femorale, radio	Maschi: ↗↘ r-BMD Maschi < 50 anni: ↗↘ l-BMD Femmine: ↔↔	Maschi > 50 anni: ↗↗ uNTX e uDpyr (libera) Maschi < 50 anni: ↗↗ ALP ossea Femmine: ↔↔	Amgen
Rogers et al. ³⁹ , 2002	180 femmine in postmenopausa (età mediana 66 anni, range 56-91 anni)	Colonna, femore e collo femorale, total body	↗↗ tb-BMD, f-BMD, fn-BMD persa dopo aggiustamento per età e BMI	↗↘ ALP ossea e sCTX ↔↔ uNTX e uDpyr (libera)	Immundiagnostik
Kudlacek et al. ²⁹ , 2003	447 maschi (età media 52 ± 13.5 anni, range 24-96) e 687 femmine (età media 50 ± 21 anni, range 19-94)	Colonna, femore, collo e trocantere femorale	Maschi: ↔↔ Femmine: ↗↘ trf-BMD	↗↘ PTH, ↗↗ sCa ↔↔ ALP, 25 OHvitD solo femmine: ↗↗ 1,25(OH) ₂ vitD	Immundiagnostik- Biomedica
Fahrleitner-Pammer et al. ³⁷ , 2003†	177 femmine sane (range 17-85 anni), 48 femmine osteoporotiche (età media 71 ± 5 anni)	nr	Sane: ↔↔	Sane: ↔↔ Osteoporotiche: ↗↗ sCTX e BGP	nr

ALP = fosfatasi alcalina; BGP = osteocalcina; f-BMD = densità minerale ossea femorale; fn-BMD = densità minerale ossea collo femorale; l-BMD = densità minerale ossea lombare; nr = non riportato; 25OHvitD = 25-idrossivitamina D; 1,25(OH)₂vitD = 1,25-diidrossivitamina D; PINP = propeptide N-terminale del collagene di tipo I; PTH = paratormone; r-BMD = densità minerale ossea radiale; sCa = calcemia sierica; sCTX = telopeptide C-terminale del collagene di tipo I sierico; sNTX = telopeptide N-terminale del collagene di tipo I sierico; tb-BMD = densità minerale ossea total body; TRAP = tartrate-resistant acid phosphatase; uDpyr = deossipiridinolina urinaria; uNTX = telopeptide N-terminale del collagene di tipo I urinario; uPyr = piridinolina urinaria; ↗↗ = correlazione positiva; ↗↘ = correlazione negativa; ↔↔ = nessuna correlazione.

* valutazioni effettuate con single energy X-ray o single photon absorptiometry; † dati desunti dal sommario in lingua inglese dell'articolo in tedesco.

Nella malattia di Paget dell'osso Alvarez et al.²³ hanno riscontrato valori di OPG aumentati, senza alcuna correlazione con l'attività di malattia, e riduzione dei livelli circolanti di OPG dopo trattamento con tiludronato. Dati simili sono stati riportati da Nuti et al.²².

Infine, in 2 pazienti affetti da malattia di Paget giovanile, una rara malattia ereditaria autosomica recessiva caratterizzata da aumentato turnover e da deformità ossee, Whyte et al.²⁰ hanno descritto una delezione in omozigosi del gene che codifica per l'OPG, identificando così la prima patologia umana da deficit geneticamente determinato di OPG.

I livelli di OPG sono stati misurati in diverse condizioni associate ad osteoporosi secondaria. Essi sono risultati aumentati nei pazienti con insufficienza renale cronica⁴⁵⁻⁴⁷ e correlati con i livelli di creatinina sierica⁴⁸. Sono più alti nei pazienti in dialisi rispetto a quelli in pre-dialisi, e nei pazienti con osteodistrofia renale di tipo II (turnover normale o basso) rispetto a quelli con tipo III (turnover alto)⁴⁷. L'aumento sembra quindi imputabile anzitutto ad una diminuita clearance renale: infatti, benché nulla si sappia, al momento attuale, del metabolismo dell'OPG, i livelli sierici, elevati nei pazienti affetti da uremia, si riducono dopo il trapianto di rene⁴⁹. Inoltre, è possibile che la differenza tra tipo II e tipo III di osteodistrofia sia dovuta all'effetto inibitorio diretto del paratormone sull'espressione stromale-osteoblastica di OPG.

Livelli circolanti aumentati di OPG sono stati inoltre riportati in pazienti epatopatici (malattia di Wilson, cirrosi biliare primitiva, cirrosi post-necrotica HCV-correlata); tuttavia, in tali soggetti non è stata riscontrata alcuna correlazione tra livelli di OPG e BMD^{27,28}; una correlazione diretta con osteocalcina e telopeptide C-terminale del collagene di tipo I è stata osservata nella cirrosi biliare primitiva²⁸, ma non nella malattia di Wilson²⁷ o nella cirrosi HCV-correlata²⁸. L'interpretazione di questi dati non è univoca. Oltre all'"ipotesi compensatoria", la correlazione riscontrata tra OPG ed aspartato aminotransaminasi nei pazienti con cirrosi HCV-correlata ha indotto gli autori a suggerire le cellule responsabili del processo infiammatorio a livello epatico come fonte degli aumentati livelli di OPG²⁸.

Fahrleitner et al.⁵⁰ hanno studiato il ruolo della terapia immunosoppressiva sullo sviluppo dell'osteoporosi post-trapianto cardiaco in uno studio trasversale ed in uno prospettico. Nei pazienti trapiantati vi è una riduzione significativa dei livelli di OPG, che tendono ad essere più bassi in coloro che sono trapiantati da più tempo. Gli stessi autori non hanno riportato alcuna significativa alterazione dei livelli di OPG in un piccolo gruppo di soggetti sottoposti a trapianto di fegato⁵¹.

Patologie neoplastiche

I livelli circolanti di OPG sono stati studiati anche in pazienti affetti da patologia tumorale, soprattutto in presenza di metastasi scheletriche. È ormai ampiamente riconosciuto che le lesioni ossee siano il risultato dell'alterazione dei normali processi di rimodellamento indotta dalla presenza delle cellule tumorali. I meccanismi con cui le cellule tumorali alterano tali processi sono probabilmente almeno in parte specifici per le diverse neoplasie, come pure diversa è la frequenza di metastatizzazione scheletrica. Uno sbilanciamento del sistema RANKL/RANK/OPG è stato invocato nella patogenesi del tumore a cellule giganti dell'osso, dell'osteosarcoma, del mieloma multiplo, dei carcinomi mammario e prostatico.

Nel caso del mieloma multiplo, una diminuzione dei livelli di OPG nel microambiente osseo è indotta dalle plasmacellule neoplastiche, che inibiscono l'espressione di OPG e internalizzano la molecola attraverso il legame con il sindecano 1⁵². Alla diminuita disponibilità di OPG si associa un aumento dei livelli locali di RANKL, la cui espressione da parte di cellule stromali-osteoblastiche e linfociti T attivati è stimolata dalle plasmacellule tumorali. Lo studio dell'espressione di RANKL da parte delle stesse cellule neoplastiche ha dato risultati discordanti⁵³. Nei pazienti con mieloma multiplo, la riduzione dei livelli circolanti di OPG è stata riportata da diversi autori e rispecchierebbe quindi la diminuzione della molecola a livello del microambiente midollare^{9,13,14}. Il mieloma multiplo rappresenta quindi il modello di patologia da deficit acquisito di OPG; non stupisce dunque l'interesse per la possibilità di una modulazione farmacologica del sistema in questi pazienti⁵³. Inoltre, il rapporto sRANKL/OPG è stato recentemente identificato e proposto come nuovo, potente indicatore prognostico¹⁴.

Lipton et al.¹³, studiando i livelli di OPG in un vasto gruppo di pazienti con neoplasie solide ed ematologiche, hanno riscontrato un aumento nei pazienti affetti da carcinoma coloretale e pancreatico, in quelli con linfomi (Hodgkin e non Hodgkin), nei pazienti con metastasi epatiche e dei tessuti molli, ma non in quelli con metastasi ossee o polmonari. L'interpretazione di questi dati è ancora incerta.

Il coinvolgimento del sistema RANKL/RANK/OPG è stato studiato anche nei pazienti con carcinoma prostatico. Questa neoplasia si associa tipicamente allo sviluppo di lesioni osteosclerotiche, come risultato di un'aumentata attività osteoblastica indotta dalle cellule neoplastiche attraverso numerosi fattori^{54,55}. Tuttavia, lo studio dei quadri istomorfometrici e dei marcatori di turnover ha incontrovertibilmente dimostrato che nelle lesioni osteosclerotiche è presente un aumento dell'attività osteoclastica, che potrebbe rivestire un ruolo nella patogenesi del

dolore osseo e contribuisce a spiegare la dimostrata efficacia terapeutica dei bisfosfonati in questa condizione⁵⁴. È stato dimostrato che le cellule di carcinoma prostatico esprimono sia OPG, sia RANKL⁵⁶; tale espressione varia in diversi modelli, e potrebbe contribuire a spiegarne il diverso potenziale osteolitico/osteosclerotico. Il pleiotropismo di questo sistema citochinico, e la sua importanza fisiopatologica, si manifestano in modo emblematico in questa neoplasia, in cui l'OPG è stata dimostrata essere anche un fattore di sopravvivenza per le cellule tumorali. L'espressione di OPG nel microambiente osseo ne farebbe un "suolo" particolarmente adatto al "seme" delle cellule prostatiche, contribuendo a spiegarne lo specifico osteotropismo. Questi risultati costituiscono a tutt'oggi un importante *caveat* per l'uso terapeutico dell'OPG⁵⁷. Per quanto concerne i livelli circolanti, Jung et al.¹⁰ hanno osservato che i livelli sierici di OPG dei pazienti con carcinoma prostatico senza metastasi ossee non differiscono da quelli dei controlli sani e dei soggetti con ipertrofia prostatica benigna, mentre sono aumentati nei pazienti con metastasi ossee. Brown et al.¹¹ inaspettatamente hanno riscontrato valori di OPG più bassi nei pazienti con carcinoma prostatico non metastatico rispetto a soggetti con ipertrofia prostatica benigna. L'interpretazione di queste divergenze è al momento difficile; occorre sottolineare che, data la produzione di OPG anche da parte delle cellule neoplastiche, i suoi livelli circolanti possono rispecchiare il processo neoplastico indipendentemente dall'interessamento scheletrico.

Rischio e patologia cardiovascolare

Il ruolo del sistema RANKL/RANK/OPG nella fisiopatologia della parete vascolare è stato inizialmente suggerito dall'inaspettato riscontro di calcificazioni arteriose nei topi *knock-out* per OPG^{58,59}, ed è attualmente oggetto di intensa attività di ricerca. Il ruolo protettivo dell'OPG, già evidenziato nei topi *knock-out*, è stato confermato dalla dimostrazione del suo effetto antiapoptotico sulle cellule endoteliali⁶⁰. Analogamente a quanto verificatosi nel contesto degli studi sul metabolismo osseo, i risultati degli studi focalizzati sulla correlazione tra OPG e danno vascolare sono apparsi inizialmente paradossali. In una popolazione di donne anziane Browner et al.³⁸ hanno riscontrato livelli di OPG aumentati in quelle diabetiche, in quelle ipertese e in quelle in terapia ormonale sostitutiva, ma non nelle fumatrici. Ancora, questo studio ha riportato un'associazione tra elevati livelli di OPG e mortalità totale e cardiovascolare, che permaneva significativa in un modello multivariato che correggeva per diabete, ipertensione, uso di terapia ormonale sostitutiva e livello di istruzione. È stato quindi ipotizzato che l'au-

mento dell'OPG circolante sia espressione di un aumento compensatorio inadeguato dell'OPG a livello vascolare, e ne rispecchi il danno. Quest'ultima ipotesi è stata del tutto recentemente confermata da tre gruppi separati. Jono et al.⁶¹ e Schoppet et al.⁶² hanno studiato soggetti sottoposti a coronarografia per dolore toracico tipico per patologia coronarica, osservando una correlazione tra i livelli sierici di OPG e la severità di malattia. Il secondo gruppo ha inoltre confermato l'aumento dei livelli di OPG nei pazienti diabetici, l'assenza di correlazione dell'OPG circolante con l'indice di massa corporea e con i livelli di colesterolo, ed ha riportato una correlazione positiva con l'omocisteina e negativa con i trigliceridi. Infine, Knudsen et al.⁶³ hanno riscontrato un aumento dei livelli plasmatici di OPG in soggetti diabetici con complicanze microangiopatiche.

Altre patologie

Per quanto attiene alle patologie endocrinologiche, Ueland et al.¹² non hanno riportato differenze significative dei livelli di OPG nei pazienti acromegalici e in quelli con deficit di ormone della crescita ad insorgenza nell'età adulta rispetto ad un gruppo di controllo. Lanzi et al.⁶⁴ hanno osservato un aumento dei livelli plasmatici di OPG in pazienti adulti con deficit di ormone della crescita dopo 6 mesi di trattamento sostitutivo.

Ueland et al.¹² hanno riscontrato, nei pazienti con sindrome di Cushing, valori aumentati di OPG. In apparente contrasto con quest'ultimo dato, Sasaki et al.^{48,65} hanno osservato in soggetti con glomerulonefrite trattati con glicocorticoidi una riduzione dei livelli circolanti di OPG già dopo pochi giorni dall'inizio della terapia. Tuttavia, Valleala et al.⁶⁶ hanno trovato livelli di OPG più alti in pazienti affetti da artrite reumatoide in trattamento con 5-10 mg/die di prednisone rispetto ai pazienti trattati con basse dosi (< 5 mg/die). Gli studiosi hanno ipotizzato che per ridurre la produzione di OPG *in vivo* sia necessaria una dose di prednisone di almeno 10 mg/die. Similmente, Masi et al.⁶⁷ hanno riportato livelli di OPG più alti in pazienti affetti da artrite giovanile idiopatica trattati con glicocorticoidi rispetto ai non trattati. Una possibile interpretazione è che l'eccesso di glicocorticoidi determini un'iniziale riduzione dei livelli circolanti come conseguenza della riduzione del numero e dell'attività degli osteoblasti, nonché della specifica inibizione dell'espressione dell'OPG, dimostrata *in vitro*⁶⁸⁻⁷⁰. Successivamente, l'aumento dei livelli sierici rispecchierebbe l'effetto lesivo dell'eccesso di glicocorticoidi sulla parete vascolare⁷¹⁻⁷³.

Ueland et al.¹² hanno riportato, inoltre, livelli aumentati di OPG nei pazienti con infezione da HIV ed in quelli con immunodeficienza variabile comune.

I livelli sierici di OPG sono elevati anche nei pazienti affetti da artrite reumatoide^{24,66,74}, artrite giovanile idiopatica⁶⁷, artrite psoriasica e spondilite anchilosante⁷⁵. Per quanto riguarda l'artrite reumatoide, è stato recentemente dimostrato il ruolo del sistema RANKL/RANK/OPG nella patogenesi delle erosioni articolari. Queste sono il risultato di un' aumentata attività osteoclastica, stimolata da un eccesso di RANKL espresso da sinoviociti e linfociti T attivati. Il ruolo di questi ultimi come sorgente di RANKL e, quindi, come regolatori dell'osteoclastogenesi, ha richiamato l'importanza delle interazioni tra sistema immunitario e apparato scheletrico, ed ha indotto alcuni autori a coniare il nuovo termine di "osteoinmunologia" per indicare lo studio di tali interazioni. Anche l'artrite reumatoide rientra così tra le patologie in cui potrebbe trovare applicazione la modulazione farmacologica del sistema RANKL/RANK/OPG^{7,8}.

Per quanto concerne i livelli circolanti di OPG nei pazienti con artrite reumatoide, l'aumento sembra più spiccato nei pazienti con fattore reumatoide positivo⁷⁴; secondo altri è limitato ai pazienti con meno di 48 anni²⁴. È stato riscontrato, inoltre, un aumento di RANKL solubile nei pazienti con artrite reumatoide rispetto al gruppo di controllo. Il rapporto OPG/sRANKL è simile nei malati e nei sani. Nessuno studio ha riportato alcuna correlazione tra la severità della malattia o lo stato infiammatorio ed i livelli circolanti di OPG^{24,66,74}. Neanche sRANKL correla con l'attività di malattia²⁶. In questi pazienti è stata valutata anche l'azione del trattamento con anti-TNF- α e della terapia ciclica con etidronato sul sistema OPG/RANKL. Mentre il trattamento con etidronato sembra non avere effetti sui livelli circolanti di OPG⁶⁶, Ziolkowska et al.²⁴ hanno osservato una riduzione statisticamente significativa dei livelli di OPG dopo 6 settimane di terapia con infliximab e la "normalizzazione" dei valori dopo 14-22 settimane. I pazienti con valori basali di OPG maggiori hanno mostrato un decremento più importante dopo terapia. Anche i livelli di sRANKL si riducono in risposta alla terapia e raggiungono valori anche più bassi dei controlli dopo 14-22 settimane. La riduzione dei livelli di OPG è più evidente nei pazienti con meno di 48 anni, mentre la riduzione dei livelli di sRANKL è più significativa nel gruppo di pazienti con più di 48 anni. Il rapporto OPG/sRANKL, invece, non mostra variazioni significative.

Conclusioni

La conoscenza del sistema RANKL/RANK/OPG ha aperto prospettive non meno ampie che inaspettate sul microambiente osseo e sulla possibilità di modularne i processi patologici. È nel fervore delle indagini fisiopatolo-

giche che si collocano gli studi sui livelli circolanti di OPG e di sRANKL. In questo ambito di ricerca una prima esigenza è rappresentata dalla comprensione e, se possibile, dal superamento delle attuali, vistose differenze analitiche in vista di una standardizzazione del dosaggio.

Una seconda necessità è la definizione dei livelli circolanti di OPG nelle età pediatrica ed adolescenziale in relazione allo sviluppo scheletrico ed alla completa organogenesi del sistema cardiovascolare.

In terzo luogo, mentre la maggior parte degli studi si è concentrata sulle differenze tra soggetti sani e patologici in studi trasversali, poco noto è l'andamento dei livelli in relazione all'attività di malattia ed alle terapie. Un ambito tutt'affatto particolare è la possibile applicazione del dosaggio di OPG e di sRANKL circolanti nel monitoraggio dei trattamenti, attualmente sperimentali, con OPG e RANK ricombinanti.

Gli iniziali entusiasmi sull'utilizzo dell'OPG circolante quale indicatore dell'attività osteoblastica sono oggi molto sopiti. Peraltro, questo interessante analita potrebbe recuperare interesse ed applicabilità clinica nel contesto dell'evoluzione peggiorativa di numerose patologie che interessano insieme osso e microambiente vascolare. Sappiamo che una percentuale non indifferente di pazienti con malattie immunomediate esprime un'importante componente vasculitica e causa gravi danni d'organo in ragione dell'alterato apporto arterioso e/o del danno del microcircolo. Emblematica in questo senso è l'artrite reumatoide, più volte citata, per la quale l'uso sempre più ampio di terapie cosiddette biologiche, sembra richiedere nuovi strumenti di monitoraggio. Altrettanto emblematica è la sclerosi sistemica, per la quale non vi sono oggi studi finalizzati a valutare il binomio osteoporosi-danno vascolare.

Si può concludere, allo stato attuale delle conoscenze, che l'applicazione dell'OPG come marker diagnostico è limitata dall'eterogeneità delle sue fonti tissutali, dal suo coinvolgimento in svariati processi fisiopatologici e dall'assenza di isoforme specifiche. Resta invece aperta la possibilità di un utilizzo dell'OPG come un importante indicatore prognostico e strumento di monitoraggio in corso di follow-up, almeno per quanto attiene alle malattie fino ad ora studiate. I primi incoraggianti dati in questa direzione necessitano però di conferma in studi prospettici longitudinali su campioni di numerosità adeguata.

Riassunto

L'osteoprotegerina (OPG), una glicoproteina appartenente alla "superfamiglia" dei recettori del fattore di necrosi tumorale, agisce come "falso" recettore di RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*), impedendone l'interazione con il recettore cellulare RANK.

RANKL/RANK/OPG rappresentano una triade citochinica che dal 1997 è oggetto di un'intensa attività di ricerca nell'ambito della fisiopatologia del metabolismo osseo, del sistema immunitario e dell'apparato cardiovascolare.

La disponibilità di anticorpi specifici ha reso possibile il dosaggio prima dell'OPG e poi della forma solubile di RANKL in condizioni fisiologiche e patologiche, con risultati spesso inattesi. Nel considerare i risultati ottenuti con il dosaggio dell'OPG sierica, occorre anzitutto ricordare che essendo la sua espressione pressoché ubiquitaria, i livelli circolanti rispecchiano la produzione da parte di numerosi tessuti, il cui contributo relativo non è noto. In secondo luogo, emerge una spiccata discrepanza nei valori assoluti di OPG circolante riportati.

Lo scopo del presente lavoro è offrire una sintesi dei dati disponibili concernenti i livelli circolanti di OPG in svariate condizioni, con particolare attenzione per i loro significati fisiopatologici e, quando presenti, clinici.

Parole chiave: Aterosclerosi; Metastasi ossee; Osteoprotegerina; Osteopatie metaboliche; RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand); Sistema immunitario.

Bibliografia

- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2-12.
- Hofbauer LC, Heufelder AE. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2355-63.
- Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 9-18.
- Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050-5.
- Scatena M, Giachelli C. The $\alpha(v)\beta_3$ integrin, NF- κ B, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 83-8.
- Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 795-823.
- Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NF κ B ligand and tumor necrosis factor- α in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 2002; 30: 340-6.
- Bolon B, Shalhoub V, Kostenuik PJ, et al. Osteoprotegerin, an endogenous antiosteoclast factor for protecting bone in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3121-35.
- Seidel C, Hjertner O, Abildgaard N, et al. Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* 2001; 98: 2269-71.
- Jung K, Lein M, von Hosslin K, et al. Osteoprotegerin in serum as a novel marker of bone metastatic spread in prostate cancer. *Clin Chem* 2001; 47: 2061-3.
- Brown JM, Vessella RL, Kostenuik PJ, et al. Serum osteoprotegerin levels are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2977-83.
- Ueland T, Bollerslev J, Godang K, Muller F, Froland SS, Aukrust P. Increased serum osteoprotegerin in disorders characterized by persistent immune activation or glucocorticoid excess - possible role in bone homeostasis. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 685-90.
- Lipton A, Ali SM, Leitzel K, et al. Serum osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2306-10.
- Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio predicts survival in multiple myeloma. Proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003; 102: 1064-9.
- Chen D, Sarikaya NA, Gunn H, Martin SW, Young JD. ELISA methodology for detection of modified osteoprotegerin in clinical studies. *Clin Chem* 2001; 47: 747-9.
- Furuya D, Kaneko R, Yagihashi A, et al. Immuno-PCR assay for homodimeric osteoprotegerin. *Clin Chem* 2001; 47: 1475-7.
- Plapp FV, Essmyer CE, Zucker ML. *ClinLab Online.com*. http://www.clinlabonline.com/quality_control.shtml (Accessed July 2000).
- Dovic A, Sartori ML, Angeli A. Correspondence re: A. Lipton et al., Serum osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2306-10. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2384-5.
- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 768-75.
- Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 175-84.
- Hofbauer LC, Schoppet M. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 1622-3.
- Nuti R, Martini G, Valenti R, et al. Serum osteoprotegerin and serum RANKL in Paget's disease [abstract]. *J Bone Miner Res* 2002; 17 (Suppl 1): S280.
- Alvarez L, Peris P, Guanabens N, et al. Serum osteoprotegerin and its ligand in Paget's disease of bone: relationship to disease activity and effect of treatment with bisphosphonates. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 824-8.
- Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A, et al. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor α treatment. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1744-53.
- Geusens P, Landewé R, Chen D, et al. Receptor activator of the nuclear factor κ B ligand (RANKL) in serum is related to bone density, cartilage breakdown and inflammation in early active rheumatoid arthritis [abstract]. *J Bone Miner Res* 2002; 17 (Suppl 1): S386.
- Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC. Low serum levels of soluble RANK ligand are associated with the presence of coronary artery disease in men. *Circulation* 2003; 107: E76.
- Hegedus D, Ferencz V, Lakatos PL, et al. Decreased bone density, elevated serum osteoprotegerin, and beta-cross-laps in Wilson disease. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1961-7.
- Szalay F, Hegedus D, Lakatos PL, et al. High serum osteoprotegerin and low RANKL in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 38: 395-400.

29. Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003; 32: 681-6.
30. Yano K, Tsuda E, Washida N, et al. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 518-27.
31. Arrighi HM, Hsieh A, Wong H, et al. Osteoprotegerin serum levels in healthy volunteers [abstract]. *Bone* 1998; 23 (Suppl 1): S298.
32. Indridason OS, Johannesson JP, Franzson L, Sigurdsson G. Age-related changes in serum osteoprotegerin levels and its relationship with biochemical markers and bone mineral density in a population based sample [abstract]. *J Bone Miner Res* 2002; 17 (Suppl 1): S398.
33. Sankaralingam S, Cheung J, Prowse J, et al. Serum osteoprotegerin (OPG): relationship with age and dietary improvement [abstract]. *J Bone Miner Res* 2002; 17 (Suppl 1): S315.
34. Scariano JK, Garry PJ, Baumgartner RN. Correlation of serum osteoprotegerin levels with age but not hormone replacement status in elderly women [abstract]. *J Bone Miner Res* 2002; 17 (Suppl 1): S268.
35. Szulc P, Hofbauer LC, Heufelder AE, Roth S, Delmas PD. Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3162-5.
36. Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ III, et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int* 2002; 13: 394-9.
37. Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H, Piswanger-Soelkner C, et al. Osteoprotegerin serum levels in women: correlation with age, bone mass, bone turnover and fracture status. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115: 291-7.
38. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 631-7.
39. Rogers A, Saleh G, Hannon RA, Greenfield D, Eastell R. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4470-5.
40. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4367-70.
41. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 2001; 142: 2205-12.
42. Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, Khosla S. Regulation of osteoprotegerin gene expression and protein production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic cells [abstract]. In: Abstracts of the 83rd Annual Meeting of the Endocrine Society, 2001: PI-496.
43. Arrighi H, Khosla S, Melton L III, Riggs BL, Bekker P, Dunstan CR. The relationship between circulating osteoprotegerin and estrogen in postmenopausal women [abstract]. *J Bone Miner Res* 2000; 15 (Suppl 1): S538.
44. Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 348-60.
45. Kazama JJ, Shigematsu T, Yano K, et al. Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 525-32.
46. Coen G, Ballanti P, Balducci A, et al. Serum osteoprotegerin and renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 233-8.
47. Haas M, Leko-Mohr Z, Roschger P, et al. Osteoprotegerin and parathyroid hormone as markers of high-turnover osteodystrophy and decreased bone mineralization in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 580-6.
48. Sasaki N, Kusano E, Ando Y, et al. Changes in osteoprotegerin and markers of bone metabolism during glucocorticoid treatment in patients with chronic glomerulonephritis. *Bone* 2002; 30: 853-8.
49. Sato T, Tominaga Y, Iwasaki Y, et al. Osteoprotegerin levels before and after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (Suppl 1): S175-S177.
50. Fahrleitner A, Prenner G, Leb G, et al. Serum osteoprotegerin is a major determinant of bone density development and prevalent vertebral fracture status following cardiac transplantation. *Bone* 2003; 32: 96-106.
51. Fahrleitner A, Prenner G, Kniepeiss D, et al. Serum osteoprotegerin levels in patients after liver transplantation and correlation to bone turnover, bone mineral density and fracture status. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 114: 717-24.
52. Standal T, Seidel C, Hjertner O, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 2002; 100: 3002-7.
53. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Kuhne CA, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 2003; 101: 2094-8.
54. Berruti A, Dogliotti L, Tucci M, Tarabuzzi R, Fontana D, Angeli A. Metabolic bone disease induced by prostate cancer: rationale for the use of bisphosphonates. *J Urol* 2001; 166: 2023-31.
55. Keller ET. The role of osteoclastic activity in prostate cancer skeletal metastases. *Drugs Today (Barc)* 2002; 38: 91-102.
56. Brown JM, Corey E, Lee ZD, et al. Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer. *Urology* 2001; 57: 611-6.
57. Hoken I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 1619-23.
58. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-19.
59. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12: 1260-8.
60. Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 20959-62.
61. Jono S, Ikari Y, Shioi A, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002; 106: 1192-4.
62. Schoppet M, Sattler AM, Schaefer JR, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC. Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1024-8.
63. 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: 39-42.
64. Lanzani R, Losa M, Villa I, et al. GH replacement therapy increases plasma osteoprotegerin levels in GH-deficient adults. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 185-91.
65. Sasaki N, Kusano E, Ando Y, Yano K, Tsuda E, Asano Y. Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 479-82.
66. Valleala H, Mandelin J, Laasonen L, Koivula MK, Risteli J, Kontinen YT. Effect of cyclical intermittent etidronate therapy

- py on circulating osteoprotegerin levels in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 527-30.
67. Masi L, Becherini L, Piscitelli E, et al. Osteoprotegerin (OPG) serum levels and OPG polymorphism in children with polyarticular juvenile idiopathic arthritis [abstract]. *J Bone Miner Res* 2002; 17 (Suppl 1): S324.
 68. Vidal NO, Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C. Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol* 1998; 159: 191-5.
 69. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999; 140: 4382-9.
 70. Dovic A, Sartori ML, Masera RG, et al. Autocrine down-regulation of glucocorticoid receptors by interleukin-11 in human osteoblast-like cell lines. *J Endocrinol* 2003; 177: 109-17.
 71. Colao A, Pivonello R, Spiezia S, et al. Persistence of increased cardiovascular risk in patients with Cushing's disease after five years of successful cure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2664-72.
 72. Angeli A, Terzolo M. Adrenal incidentaloma - a modern disease with old complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4869-71.
 73. Walker BR, Souverein PC, Wei L, et al. Glucocorticoid therapy increases event rates from cardiovascular disease; results from two pharmacoepidemiological studies of 265 445 participants [abstract]. In: Abstracts of the 85th Annual Meeting of the Endocrine Society, 2003: 101.
 74. Feuerherm AJ, Borset M, Seidel C, et al. Elevated levels of osteoprotegerin (OPG) and hepatocyte growth factor (HGF) in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2001; 30: 229-34.
 75. Grisar J, Bernecker PM, Aringer M, et al. Ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and reactive arthritis show increased bone resorption, but differ with regard to bone formation. *J Rheumatol* 2002; 29: 1430-6.

Manoscritto ricevuto il 25.7.2003, accettato il 7.11.2003.

Per la corrispondenza:

Prof. Alberto Angeli, Clinica Medica Generale, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino, Azienda Ospedaliera San Luigi, Regione Gonzole 10, 10043 Orbassano (TO). E-mail: alberto.angeli@unito.it