

Wpływ raloksyfenu na czynniki ryzyka kalcyfikacji naczyń

Wojciech Karwowski¹, Beata Naumnik²,
Wiesława Karwowska-Polecka³, Agnieszka Karwowska⁴, Michał Myśliwiec²

¹NZOZ Poliklinika Ginekologiczno-Położnicza dr K. Arciszewski w Białymstoku

²Klinika Nefrologii i Transplantologii z Ośrodkiem Dializ, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

³Oddział Chorób Wewnętrznych o profilu kardiologicznym,
Samodzielny Szpital Miejski im. PCK w Białymstoku

⁴Oddział Radioterapii II, Białostockie Centrum Onkologii

Streszczenie

Kalcyfikacja naczyń silnie koreluje z występowaniem chorób układu sercowo-naczyniowego i stanowi ważny czynnik predykcyjny zdarzeń sercowo-naczyniowych, w tym niedokrwiennej choroby serca i zgonu. Jest procesem aktywnym, w który zaangażowane są liczne mechanizmy kontrolujące. Dokładne poznanie i zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za odkładanie złogów wapnia może stać się istotnym punktem uchwytu leczenia naczynioprotekcyjnego. Czynniki ryzyka kalcyfikacji naczyń są podobne do czynników ryzyka miażdżycy: hipertriglicydemia, podwyższone stężenie cholesterolu frakcji LDL, obniżone stężenie cholesterolu frakcji HDL, otyłość, nadciśnienie tętnicze. Wykazano, że cukrzyca oraz aktywacja procesów zapalnych znacząco zwiększają ryzyko odkładania złogów wapnia w ścianie naczynia.

Mimo wieloletnich badań nadal nie do końca poznany jest wpływ hormonalnej terapii zastępczej na układ sercowo-naczyniowy. Wpływ ten zależy od obecności czynników ryzyka, czasu rozpoczęcia substytucji, rodzaju stosowanych leków. W ostatnim czasie przeprowadzono wiele badań oceniających wpływ selektywnego modulatora receptora estrogenowego (SERM) — raloksyfenu — na proces kalcyfikacji naczyń.

Celem pracy jest zestawienie aktualnej wiedzy na temat wpływu raloksyfenu na czynniki ryzyka kalcyfikacji naczyń z uwzględnieniem reaktywności ścian naczyń krwionośnych oraz układu osteoprotegryna/receptor aktywujący jądrowy czynnik NF- κ B/ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik NF- κ B (OPG/RANK/RANKL) — istotnego łącznika kalcyfikacji z osteoporozą. (Folia Cardiologica Excerpta 2012; 7, 2: 101–109)

Słowa kluczowe: kalcyfikacja naczyń, osteoporoza, estrogeny, raloksyfen

Wstęp

Kalcyfikacja ścian naczyń redukuje ich elastyczność, wpływając na parametry hemodynamiczne układu krążenia. Rozwój nadciśnienia tętniczego, przerostu mięśnia sercowego, choroby niedokrwiennej, zwężenia lub niedomykalności zastawek, niewydolności serca czy tętnic obwodowych znamienne

zwiększa chorobowość i śmiertelność wśród pacjentów po 60. roku życia [1, 2]. Stopień zaawansowania i rozległość depozytów wapnia w ścianie naczynia to kluczowy czynnik ryzyka epizodów niedokrwienych [3].

Czynniki ryzyka kalcyfikacji naczyń są podobne do czynników ryzyka miażdżycy. Są to: hipertriglicydemia, podwyższone stężenie cholesterolu

Adres do korespondencji: Lek. Wojciech Karwowski, Oddział Patologii Ciąży, SP ZOZ Wojewódzki Szpital Zespolony, ul. Boboli 89/4, 15–864 Białystok, tel.: 602 47 77 88, e-mail: wowus@hotmail.com

frakcji lipoprotein o małej gęstości (LDL, *low density lipoprotein*), obniżone stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o dużej gęstości (HDL, *high density lipoprotein*), otyłość, nadciśnienie tętnicze [4, 5]. Wykazano, że cukrzyca oraz niewydolność nerek znacząco zwiększają ryzyko odkładania złogów wapnia w ścianie naczyń [6, 7]. Pomimo redukcji klasycznych czynników ryzyka, niezależnie od wieku, obecność licznych depozytów wapnia w ścianie naczyń 5-krotnie zwiększa prawdopodobieństwo incydentów wieńcowych w porównaniu z pacjentami, u których nie stwierdzono zaawansowanej kalcyfikacji ścian naczyń wieńcowych czy łuku aorty [2, 8].

Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały wiele podobieństw pomiędzy patologicznym odkładaniem złogów wapniowych a aktywnie sterowanymi procesami zachodzącymi w tkance kostnej [9, 10]. Zwapnienia tętnic występują nie tylko w połączeniu z zaawansowaną miażdżycą, ale również w formie izolowanej w cukrzycy czy niewydolności nerek, którym towarzyszą zmiany hormonalne i odpowiednio stres oksydacyjny lub zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej [11, 12].

Kalcyfikacja naczyń jest procesem aktywnym, w którym dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy mechanizmami hamującymi (np. białko Gla, osteopontyna, pirofosforany) a promującymi precipitację fosforanów wapnia. Wykazano, że w procesie kalcyfikacji naczyń bierze udział wiele protein typowych dla procesów przebudowy zachodzących w tkance kostnej, do których zalicza się m.in. układ osteoprotegeryna/receptor aktywujący jądrocytyczny czynnik NF- κ B (*nuclear factor κ B*)/ligand receptora aktywującego jądrocytyczny czynnik NF- κ B (OPG/RANK/RANKL) [13, 14].

Mniejsza częstość występowania chorób układu sercowo-naczyniowego u kobiet w okresie przedmenopauzalnym niż u mężczyzn oraz istotny wzrost liczby incydentów sercowo-naczyniowych i osteoporozy u kobiet w okresie pomenopauzalnym wskazują na wpływ estrogenów na układ krążenia i metabolizm tkanki kostnej. Terapia estrogenowa zastosowana u kobiet w okresie pomenopauzalnym zmniejsza nasilenie odkładania się złogów wapniowych w ścianie naczyń [15, 16]. Wynika to z pośredniego działania na czynniki ryzyka kalcyfikacji oraz bezpośredniego wpływu zarówno genomowego, jak i pozagenomowego na makrofagi, komórki śródbłonna i mięśniówki gładkiej ścian naczyń. Wykazano, że estradiol moduluje wydzielanie białek macierzy (osteopontyna, MGP, RANKL/OPG), hamuje proliferację i różnicowanie komórek mięśni gładkich naczyń (VSMC, *vascular smooth muscle cell*) oraz aktywność komórek kalcyfikujących [17–19].

Wykorzystywany w terapii osteoporozy pomenopauzalnej selektywny modulator receptora estrogenowego — raloksyfen, pobudzając ten receptor w tkankach takich jak układ sercowo-naczyniowy i tkanka kostna, wykazuje korzystny wpływ estrogenopodobny, nie powodując jednocześnie niekorzystnych skutków ubocznych przewlekłej estrogeneroterapii ze strony endometrium.

W ostatnich latach nastąpił ogromny postęp w zrozumieniu mechanizmów leżących u podłoża kalcyfikacji naczyń, m.in. roli układu OPG/RANK/RANKL w regulacji odkładania złogów wapnia. Niniejsza praca ma na celu podsumowanie dotychczasowych badań na temat wpływu raloksyfenu na czynniki ryzyka i mechanizmy prowadzące do rozwoju kalcyfikacji naczyń, ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływania na układ OPG/RANK/RANKL.

Wpływ raloksyfenu na czynniki ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego

Wpływ raloksyfenu na gospodarkę lipidową, węglowodanową, homocysteinę

Wśród głównych czynników ryzyka rozwoju chorób układu krążenia wymienia się zaburzenia gospodarki lipidowej, węglowodanowej, nadciśnienie tętnicze, hiperhomocysteinemię, wzmożoną aktywność układu krzepnięcia i procesy zapalne.

W ostatnim dziesięcioleciu ukazało się wiele publikacji potwierdzających korzystny wpływ raloksyfenu na parametry gospodarki lipidowej. Zarówno w grupie zdrowych kobiet w okresie pomenopauzalnym, jak i w grupie osób z rozpoznaną cukrzycą typu 2 czy osteoporozą wykazano istotne statystycznie zmniejszenie stężenia cholesterolu frakcji LDL, triglicerydemii, zmniejszenie stężenia lipoproteiny (a) i wzrost stężenia cholesterolu frakcji HDL. Ponadto stwierdzono, że raloksyfen przeciwdziała oksydacji lipoprotein o małej gęstości (LDL) [20, 21], zapobiega nadmiernemu przyleganiu makrofagów do ściany naczyń, zmniejszając ekspresję białka chemotaktycznego makrofagów typu 1 (MCP-1, *macrophage chemotactic protein-1*) [22, 23] oraz cząsteczek adhezji komórkowej naczyń 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*) [24]. Lek ten wykazuje także działanie antymitotyczne na komórki mięśni gładkich oraz indukuje ich apoptozę [18, 25]. Niezależne grupy badaczy dowiodły, że raloksyfen podawany królikom po usunięciu gonad i karmionych karmą bogatą w cholesterol zmniejsza zawartość cholesterolu w blaszkach miażdżycowych aorty [26, 27]. Choi i wsp. stwierdzili, że terapia raloksyfenem zmniejsza objętość blaszki

miażdżycowej i zwiększa jej wytrzymałość mechaniczną. Analiza struktury zmian miażdżycowych wykazała mniejszą infiltrację blaszek makrofagami, zmniejszoną aktywność cyklooksygenazy 2 (COX-2, *cyclo-oxygenase-2*), MCP-1 i metaloproteinazy 1 (MMP-1, *metalloproteinase-1*) [28].

Wyniki licznych badań wskazują, że raloksyfen nie wpływa na glikemię na czczo [29–34], stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) [29, 32], insulinemię na czczo [29–33] czy stężenie peptydu C we krwi oraz wrażliwość na insulinę [32, 33] u zdrowych kobiet w okresie pomenopauzalnym, jak również u pacjentek z rozpoznąną cukrzycą.

W 2002 roku Cucinelli i wsp. ocenili wpływ 3-miesięcznej terapii raloksyfenem na metabolizm węglowodanów. W badaniu stwierdzono, że związek ten nie modyfikuje glikemii, insulinemii ani stężenia peptydu C mierzonych na czczo. Również po doustnym obciążeniu glukozą nie obserwowano różnic w wartościach glikemii ani insulinemii, podczas gdy stężenie peptydu C znamienne wzrosło w grupie kobiet poddanych terapii badanym lekiem. Wykazano natomiast korzystny wpływ raloksyfenu na wydzielanie insuliny po obciążeniu glukozą u pacjentek z wyjściową hiperinsulinemią. W grupie tych kobiet zaobserwowano znamienne spadki insulinemii jako efekt zwiększonego klirensu wątrobowego, jak również poprawy obwodowej wrażliwości na insulinę. Takiego działania nie stwierdzono w grupie kobiet z normoinsulinemią poddanych terapii raloksyfenem, a także w grupie kobiet otrzymujących placebo. Badanie to z jednej strony potwierdza wcześniejsze doniesienia o braku wpływu raloksyfenu na metabolizm węglowodanów, a z drugiej strony wskazuje na poprawę wrażliwości na insulinę u kobiet z rozpoznąną hiperinsulinomią [34].

W 2007 roku Bayram i wsp., porównując wpływ raloksyfenu i tibolonu na stężenie homocysteiny w grupie zwierząt poddanych owariektomii, wykazali wzrost hiperhomocysteinemii pod wpływem raloksyfenu, jednak bez istotnego znaczenia jeśli chodzi o histopatologiczne zmiany w budowie ściany naczyniowej [35]. W badaniach klinicznych przeprowadzonych w 2008 roku Oktem i wsp. stwierdzili, że raloksyfen oprócz korzystnego wpływu na profil lipidowy obniża również stężenie homocysteiny u kobiet w wieku pomenopauzalnym z rozpoznąną osteoporozą [36].

Wpływ raloksyfenu na parametry procesu zapalnego

Odczyn zapalny stanowi istotne ogniwo w patomechanizmie rozwoju blaszki miażdżycowej, jej pęknięcia i tworzenia zakrzepu zamykającego światło

naczynia [37]. Markerami zaawansowania stanu zapalnego są m.in. białko C-reaktywne (CRP, *C-reactive protein*), interleukina 1 (IL-1, *interleukin-1*), interleukina 6 (IL-6) i czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*). Podwyższone stężenia tych związków wiążą się ze zwiększeniem ryzyka rozwoju miażdżycy i powikłań sercowo-naczyniowych [37, 38]. Białko C-reaktywne, a szczególnie CRP o wysokiej czułości (hs-CRP, *high sensitivity-CRP*), uważa się za czuły wykładnik ryzyka epizodów niedokrwiennych u pacjentów z rozpoznąną chorobą wieńcową, szczególnie u osób bez istotnych zaburzeń lipidowych [39].

W ostatnich latach ukazało się wiele badań, oceniających wpływ raloksyfenu na procesy odpowiedzi zapalnej. Wielokrotnie wskazywano skuteczność tego leku w obniżeniu hs-CRP, IL-4, IL-7, IL-18, MCP-1, E-selektyn, RANTES, co przyczyniało się do obniżonej odpowiedzi zapalnej [40–45]. Korzystny, supresyjny wpływ związku na zależne od makrofagów procesy zapalne został opisany przez Lee i wsp. Autorzy stwierdzili przeciwwapalny wpływ raloksyfenu, który blokował stymulowaną lipopolisacharydem aktywację makrofagów. W badaniu tym wykazano zmniejszenie aktywacji kaskady sygnałowej PI 3 kinase-Akt-NF- κ B oraz ekspresji licznych genów, m.in. genu indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS, *nitric oxide synthase*) [46].

Wpływ na układ krzepnięcia i fibrylizy

W okresie pomenopauzalnym zachodzą istotne zmiany w układzie krzepnięcia i fibrylizy, klinicznie manifestujące się zwiększoną gotowością prozakrzepową. Zmiany, takie jak wzrost stężenia fibrynogenu, VII i VIII czynnika krzepnięcia [47–49], przy zwiększonej aktywności PAI-1 [50] prowadzą do wzrostu gotowości prozakrzepowej i zmniejszonej aktywności fibrynolitycznej. Jednak po menopauzie dochodzi także do zwiększenia stężenia niektórych inhibitorów krzepnięcia, takich jak antytrombina czy białko C, działających antagonistycznie do wyżej wymienionych czynników [51].

Badania prowadzone nad hormonalną terapią zastępczą (HTZ), jako profilaktyką pierwotną bądź wtórną chorób sercowo-naczyniowych, wykazały wzrost ryzyka wystąpienia zakrzepicy żyłnej i chorób tętnic. Zarówno wyniki badań prospektywnych oceniających jakość profilaktyki pierwotnej (WHI, *Women's Health Initiative*), jak i wtórnej (HERS, *Heart and Estrogen/progestin Replacement Study*) potwierdziły początkowy wzrost ryzyka tych chorób, który przemijał wraz z czasem stosowania HTZ [52, 53]. Fibrynogen, będący substratem do tworzenia fibryny, stanowi ważne ogniwo w patomechanizmie

zmie wzrostu lepkości krwi oraz agregacji płytek. Wykazano, że stężenie fibrynogenu wzrasta w okresie pomenopauzalnym [47, 48, 50]. Zmniejszenie fibrynogenemii stanowi zatem istotny element profilaktyki przeciwzakrzepowej.

Podobnie jak złożona terapia zastępcza, raloksyfen zmniejsza stężenie fibrynogenu, jednocześnie nie wpływając na stężenie czynnika VII, stabilne kompleksy trombina–antytrombina, stężenie fibrynopeptydu A oraz peptydów aktywacyjnych F₁₊₂ będących wskaźnikami natężenia trombogenezy [29, 30, 54, 55]. Wykazano, że raloksyfen w sposób istotny nie oddziałuje na antytrombinę, naturalny antykoagulant ograniczający powstawanie fibryny, której obniżenie stężenia wiąże się ze zwiększonym ryzykiem powikłań zakrzepowych. Ponadto związek ten nie wykazuje istotnego wpływu na stężenie tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA, *tissue plasminogen activator*) [30], stężenie inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1*) [30, 54] czy stężenie D-dimeru, będącego czułym wskaźnikiem aktywacji układu krzepnięcia i fibrylizacji. Oceniając wpływ raloksyfenu na czynność płytek krwi, wykazano, że lek ten poprawia metabolizm trombocytów poprzez zwiększenie biodostępności NO, zmniejszenie ekspresji iNOS, zwiększenie aktywności cyklooksygenazy-2 (COX-2) oraz korzystny wpływ na lipidogram, prowadząc do zmniejszonej adhezji trombocytów, mogącej mieć istotne znaczenie w patogenezie zakrzepicy [57].

Analiza przeprowadzona wśród kobiet w okresie pomenopauzalnym z podwyższonym ryzykiem incydentów wieńcowych wykazała wzrost częstości zakrzepicy żyłnej oraz śmiertelnych udarów mózgu szczególnie wśród palaczek tytoniu. Raloksyfen jednak nie zwiększał ogólnej liczby udarów mózgu [58].

Wpływ raloksyfenu na reaktywność naczyń i przebudowę ściany naczyniowej

Relaksacyjny wpływ raloksyfenu na reaktywność naczyń zaobserwowano *in vitro* w pierścieniach z tętnicy wieńcowej bez lub z zachowanym śródbłonkiem oraz w pierścieniach z żył udowych. Zarówno we fragmentach pochodzących z króliczych tętnic wieńcowych, jak i w pierścieniach z żył udowych świni opisano relaksacyjny wpływ raloksyfenu, szczególnie w pierścieniach z zachowanym śródbłonkiem naczyniowym [59, 60]. W 2002 roku Simoncini i wsp. [61] opisali niegenomową, zależną od receptora estrogenowego α aktywację endotelialnej syntazy tlenu azotu (eNOS, *endothelial nitric*

oxide synthase), która nie była blokowana przez specyficzne inhibitory transkrypcji i translacji. Ponadto w badaniach przeprowadzonych w kolejnych latach wykazano, że relaksacyjny wpływ związku nie jest blokowany przez inhibitory receptora estrogenowego (ICI 182,780), sugerując możliwość występowania dodatkowego receptora błonowego dla SERM lub blokadę tylko niektórych mechanizmów zależnych od aktywacji receptora estrogenowego (ER, *estrogen receptor*) [62]. Powyższe wyniki potwierdzono także w badaniach *in vitro*, w których raloksyfen zwiększał zależną od receptora estrogenowego niegenomową aktywację eNOS i produkcję NO [63, 64].

Raloksyfen poprawia funkcję śródbłonna, zwiększając biodostępność NO poprzez wzrost ekspresji i aktywności eNOS, oraz redukuje powstawanie wolnych rodników tlenowych. W badaniach *in vivo* w 2004 roku Ogita i wsp. [66] opisali kardio-protেকcyjny wpływ tego leku, charakteryzujący się zmniejszeniem przerostu mięśnia sercowego i jego dysfunkcji w chirurgicznie indukowanym nadciśnieniu tętniczym u myszy. Zdaniem autorów związek zmniejsza również reperfuzyjne uszkodzenie mięśnia sercowego poprzez mechanizmy zależne od NO i aktywacji kanałów potasowych [67]. Inna grupa badawcza stwierdziła, że raloksyfen zmniejsza reperfuzyjne zaburzenia rytmu serca oraz apoptozę komórek miokardium między innymi poprzez zmniejszenie infiltracji neutrofilów, aktywności kaspazy-3 i czynnika jądrowego kappaB [68].

Pomimo licznych danych wskazujących na pozytywny wpływ raloksyfenu na produkcję NO i reaktywność naczyń w badaniach przedklinicznych, badania kliniczne budzą wiele kontrowersji, jeśli chodzi o ocenę oddziaływania tego leku na przebudowę ściany naczynia i jej reaktywność. Wśród kobiet zakwalifikowanych do badania MORE i jego kontynuacji CORE (*Continuing Outcomes Relevant to Evista*) nie wykazano, aby raloksyfen poprawiał podatność ściany naczyniowej czy też stosunek grubości warstwy wewnętrznej do środkowej ściany naczynia (tzw. *intima-media thickness*) [69]. Badania te obejmowały kobiety w okresie pomenopauzalnym z osteoporozą w różnym wieku (średnia wieku 69 ± 19 lat), co mogło wpłynąć na rezultat badania ze względu na różny stopień zaawansowania miażdżycy. Natomiast w 2008 roku Dias i wsp. wykazali, że raloksyfen nie oddziałuje na sztywność ściany naczyniowej u kobiet w okresie wczesnej menopauzy (mniej niż 10 lat od menopauzy) [70].

Wiele badań potwierdza jednak korzystny wpływ raloksyfenu na czynność ściany naczynia. Wykazano oparty na tlenku azotu wazorelaksacyjny wpływ leku, jak również poprawę przepływu

naczyniowego wśród pacjentek leczonych z powodu nadciśnienia tętniczego [71]. Stwierdzono także, że terapia lekiem zmniejsza progresję przerostu mięśniówki naczyń oraz może poprawiać funkcję rozkurczową lewej komory [72–75]. Istotnym czynnikiem zmniejszającym hipertrofię miocytów może być hamujący wpływ aktywatorów ER- α na produkcję prostacykliny PGI₂, insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (IGF-1, *insulin-like growth factor-1*) i naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), jak również produkcję kolagenu przez miocyty [76]. Pod wpływem stymulacji receptora ER- α zwiększa się ekspresja IGF-1 i COX-2 w endotelium, wpływając pobudzająco na produkcję prostacykliny i wzrost komórek śródbłonka. Natomiast w komórkach mięśniowych warstwy środkowej pobudzenie ER przez estradiol lub raloksyfen prowadzi do zmniejszenia ekspresji IGF-1 i jego receptora oraz inhibicji, migracji i proliferacji komórek mięśniowych (VSMC), co może mieć istotne znaczenie w zapobieganiu przerostowi warstwy środkowej ściany naczynia [77].

Wpływ raloksyfenu na układ OPG/RANK/RANKL

Udowodniono, że w procesie kalcyfikacji naczyń bierze udział wiele protein typowych dla procesów przebudowy zachodzących w tkance kostnej, m.in. układ OPG/RANK/RANKL [13, 14, 78]. Układ ten został pierwotnie odkryty jako odpowiedzialny za proces remodelingu kostnego. RANKL, wiążąc się z receptorem RANK, wyzwala kaskadę sygnałową, która reguluje różnicowanie, funkcje i przetrwanie osteoklastów. Osteoprotegeryna, wydzielana przez komórki osteoblastyczne, działa jako fałszywy receptor, wiążąc RANKL i blokując jego interakcję z receptorem RANK. Skutkuje to zahamowaniem osteoklastogenezy, co wiąże się z zahamowaniem resorpcji kości.

Wykazano też, że układ OPG/RANK/RANKL uczestniczy w patogenezie schorzeń układu naczyniowego. Działająca auto- i parakrynnie osteoprotegeryna jest uwalniana głównie z komórek mięśniówki gładkiej ściany naczynia (VSMC) i śródbłonka. Stwierdzono związek między stężeniem osteoprotegeryny w osoczu a nasileniem procesu miażdżycy [79]. Nie jest do końca jasne, czy duże stężenie OPG w surowicy jest markerem nasilenia miażdżycy, mediatorem procesów jej postępu, czy świadczy o nasileniu obrony przed kalcyfikacją ściany naczynia. W ostatnich latach próbuje się łączyć stężenie OPG w osoczu z podatnością ścian naczyń,

wskazując na liniową zależność między stężeniem OPG a sztywnością naczyń, co mogłoby być wykorzystane w diagnostyce patologii naczyń obwodowych [80].

W początkowych stadiach powstawania miażdżycy w ścianie naczyń stwierdzono obecność zarówno OPG, jak i RANKL. W zaawansowanych zmianach ekspresja RANKL znamienne wzrasta, podczas gdy OPG nie zmienia się lub jest obniżona. Ekspresja OPG w uwapnionych blaszkach jest istotnie zredukowana. Wykazano, że RANKL zwiększa ekspresję białka promującego kalcyfikację — BMP-2 w komórkach śródbłonka aorty (HAEC, *human aortal endothelial cells*), a zmniejsza ekspresję inhibitora kalcyfikacji — białka MGP w komórkach mięśniowych aorty (HASMC, *human aorta smooth muscle cells*). Ponadto stymuluje odkładanie złogów wapnia oraz różnicowanie osteoklastów z VSMC i sprzyja destabilizacji blaszek miażdżycowych. W przeciwieństwie do RANKL, OPG zmniejsza apoptozę komórek śródbłonka (hamuje TRAIL) oraz nasila angiogenezę, poprawiając homeostazę naczyniową [79, 81, 82]. Stwierdzono, że OPG zapobiega m.in. kalcyfikacji ścian naczyń podczas terapii witaminą D₃ lub warfaryną [83].

W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach potwierdzono ochronny wpływ OPG na ścianę naczynia. U myszy pozbawionych receptora LDL, karmionych bogatolipidową dietą OPG znamienne zmniejszała kalcyfikację ściany naczynia, nie wpływając na rozmiar i liczbę blaszek miażdżycowych [84].

Wydzielanie OPG zależy od hormonów płciowych. Stwierdzono wyższe stężenia u kobiet niż u mężczyzn oraz spadek stężenia OPG po menopauzie, równoważony stosowaną suplementacją hormonalną [85, 86]. Wykazano, że wśród zdrowych kobiet w okresie pomenopauzalnym 6-miesięczna terapia raloksyfenem istotnie zwiększa stężenie OPG [87], natomiast w podobnej wiekowo, ale obciążonej osteoporozą grupie kobiet stwierdzono, że lek ten znamienne zmniejsza poziom RANKL i przejściowo stężenie OPG, które wraca do normy po roku terapii. Głównym magazynem OPG w organizmie są kości oraz układ naczyniowy. Nie jest do końca jasne, czy wpływ raloksyfenu na stężenie OPG i RANKL w osoczu wynika głównie z działania osteoprotekcyjnego czy procesów zachodzących w ścianie naczyń [88]. Badając wpływ raloksyfenu i estradiolu na monocyty krwi obwodowej, u kobiet w okresie pomenopauzalnym wykazano, że roczna terapia zmniejsza zarówno ekspresję OPG, RANK, RANKL, jak i ogranicza nasilenie osteoporozy [89]. Należy podkreślić, że monocyty odgrywają istotną rolę w procesie rozwoju blaszek miażdżycowych.

U zwierząt poddanych zabiegowi usunięcia jajników zaobserwowano znacznie nasiloną kalcyfikację ścian naczyń oraz wzrost stosunku OPG/RANKL głównie w wyniku zmniejszenia stężenia RANKL (odwrotnie niż w układzie kostnym) [90]. W 2010 roku Osako i wsp., badając wpływ owariektomii na naczynia, zauważyli, że wiąże się ona z nasiloną kalcyfikacją ściany oraz zwiększoną ekspresją RANKL, RANK i osteopontyny. Stwierdzili również, że podanie suplementacji hormonalnej hamuje aktywność szlaku BMP-2 i zwiększa ekspresję MGP mRNA [91].

W badaniach *in vitro* wykazano, że VSMC podane hodowli w warunkach nadmiaru fosforanów wapnia i estradiolu lub raloksyfenu podtrzymują ekspresję OPG. Aktywacja receptora estrogenowego zapobiega różnicowaniu VSMC w komórki osteoblastyczne oraz zmniejsza odkładanie złogów wapnia [19]. Oceniając wpływ estradiolu i raloksyfenu na VSMC i endotelium naczyń sutkowych (HMEC, *human mammary endothelial cells*), Wang i wsp. stwierdzili, że oba te związki hamują indukowaną angiotensyną II proliferację wyżej wymienionych komórek poprzez wpływ na kaskadę sygnałową JAK/STAT(3) [92]. Z kolei Oviedo i wsp. wykazali pobudzający proliferację wpływ raloksyfenu na komórki śródbłonna pochodzenia pępowinowego (HUV-EC, *human umbilical vein endothelial cells*) [93].

Podsumowanie

Terapia raloksyfenem wiąże się z pozytywnym wpływem na czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych: wzrostem stężenia cholesterolu frakcji HDL oraz spadkiem stężenia cholesterolu frakcji LDL, fibrynogenu, homocysteiny i zmniejszeniem nasilenia procesów zapalnych. Mimo niejednoznacznych badań pozytywny wpływ raloksyfenu na syntezę NO i COX-2, jak również zmniejszenie ekspresji czynników wzrostowych skutkuje poprawą właściwości mechanicznych ściany naczynia, zwiększając reaktywność naczyń i zmniejszając negatywny wpływ sił ścinających, tak istotnych w uszkodzeniu śródbłonna naczyniowego. Biorąc pod uwagę fakt, że wymienione czynniki predysponują i inicjują rozwój blaszki miażdżycowej, na podłożu której dochodzi do kalcyfikacji warstwy wewnętrznej naczynia, to terapia raloksyfenem powinna się wiązać ze zmniejszeniem odkładania złogów wapniowych, szczególnie właśnie w warstwie wewnętrznej ściany.

Podobieństwo patogenezy kalcyfikacji ściany naczynia do procesów zachodzących w tkance kostnej sugeruje korzystny wpływ aktywacji receptora estrogenowego na aktywację i progresję zmian pro-

wadzących do odkładania depozytów fosforanu wapnia. Wynika on z pośredniego działania na czynniki ryzyka kalcyfikacji oraz bezpośredniego wpływu genomowego i pozagenomowego na makrofagi, komórki śródbłonna i mięśniówki gładkiej ścian naczyń. Wykazano, że estradiol moduluje wydzielanie białek macierzy (osteopontyna, MGP, RANKL/OPG), hamuje proliferację i różnicowanie VSMC oraz aktywność komórek kalcyfikujących.

Udowodniono, że raloksyfen zmniejsza częstość klinicznych złamań kręgow i estrogenozależnych nowotworów piersi. Obecnie lek ten jest zarejestrowany w terapii osteoporozy pomenopauzalnej. Szczególnie wskazany jest w grupie kobiet z podwyższonym ryzykiem złamań kręgow. Prowadzone przez prawie 6 lat badania nie potwierdziły korzystnego wpływu tego związku na przebieg i powikłania choroby wieńcowej u kobiet w wieku pomenopauzalnym (*RUTH Trial*). Tylko w grupie kobiet poniżej 60. roku życia zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie częstości incydentów wieńcowych. Wykazano jednak, że w grupie kobiet przyjmujących raloksyfen zwiększa się ryzyko incydentów zakrzepicy żyłnej, co należy uwzględnić przy rozpoczynaniu terapii tym lekiem.

Mechanizmy, w jakich raloksyfen zmniejsza ryzyko incydentów krążeniowych u kobiet we wczesnym okresie pomenopauzalnym, nie zostały do końca poznane. Prawdopodobnie wczesne rozpoczęcie suplementacji hormonalnej zapobiega nadmiernej aktywacji mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój miażdżycy, przerostu warstwy środkowej naczynia i promocji tworzenia komórek kalcyfikujących. Zrozumienie mechanizmów leżących u podłoża korzystnego wpływu HTZ lub SERM na układ krążenia znacząco wpłynie na jakość życia kobiet w okresie pomenopauzalnym, które poza zmniejszeniem nasilenia osteoporozy będą mogły liczyć na podtrzymanie wpływu endogennych estrogenów na układ sercowo-naczyniowy.

Piśmiennictwo

1. Allison M.A., Criqui M.H., Wright C.M. Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 331–336.
2. Wayhs R., Zelinger A., Raggi P. High coronary artery calcium stores pose an extremely elevated risk for hard events. *J Am. Coll. Cardiol.* 2002; 39: 225–230.
3. Vliegenthart R., Oudkerk M., Hofman A. i wsp. Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. *Circulation* 2005; 112: 572–577.
4. Schmermund A., Baumgart D., Mohlenkamp S. i wsp. Natural history and topographic pattern of progression of coronary calcification in symptomatic patients: an electron-beam CT study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 421–426.

5. Pohle K., Maffert R., Ropers D. i wsp. Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation* 2001; 104: 1927–1932.
6. Schurgin S., Rich S., Mazzone T. Increased Prevalence of Significant Coronary Artery Calcification in Patients with Diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 335–338.
7. Goodman W.G., Goldin J., Kuizon B.D i wsp. Coronary-Artery Calcification in Young Adults with End-Stage Renal Disease Who Are Undergoing Dialysis. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342: 1478–1483.
8. Iribarren C., Sidney S., Sternfeld B., Browner W.S. Calcification of the Aortic Arch: Risk Factors and Association with Coronary Heart Disease, Stroke, and Peripheral Vascular Disease. *JAMA* 2000; 283: 2810–2815.
9. Raggi P., Callister T.Q., Cooil B. i wsp. Identification of patients at increased risk of first unheralded acute myocardial infarction by electron-beam computed tomography. *Circulation* 2000; 101: 850–855.
10. Jeziorska M., McCollum C., Wooley D.E. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows. Arch.* 1998; 433: 559–565.
11. Budoff M.J., Yu D., Nasir K. i wsp. Diabetes and progression of coronary calcium under the influence of statin therapy. *Am. Heart J.* 2005; 149: 695–700.
12. Block G.A., Spiegel D.M., Ehrlich J. i wsp. Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. *Kidney Int.* 2005; 68: 1815–1824.
13. Bucay N., Sarosi L., Dunstan C.R. i wsp. Osteoprotegrin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998; 12: 1260–1268.
14. Bennett B.J., Scatena M., Kirk E.A. i wsp. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 2117–2124.
15. Mackey R.H., Kuller L.H., Sutton-Tyrrell K., Evans R.W., Holubkov R., Matthews K.A. Hormone therapy, lipoprotein subclasses, and coronary calcification: the Healthy Women Study. *Archives of Internal Medicine* 2005; 165: 510–515.
16. Manson J., Allison M., Rossouw J.E. i wsp. Estrogen Therapy and Coronary-Artery Calcification. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356: 2591–2602.
17. Doherty T.M., Asotra K., Fitzpatrick L.A. i wsp. Calcification in atherosclerosis: Bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100: 11201–11206.
18. Takahashi K., Ohmichi M., Yoshida M. i wsp. Both estrogen and raloxifene cause G1 arrest of vascular smooth muscle cells. *J. Endocrinol.* 2003; 178: 319–329.
19. Rzewuska-Lech E., Jayachandran M., Fitzpatrick L.A., Miller V.M. Differential effects of 17 β -estradiol and raloxifene on VSMC phenotype and expression of osteoblast-associated proteins. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005; 289: E105–E112.
20. Zuckerman S.H., Bryan N. Inhibition of LDL oxidation and myeloperoxidase dependent tyrosyl radical formation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene (LY139481 HCL). *Atherosclerosis* 1996; 126: 65–75.
21. Arteaga E., Villaseca P., Bianchi M., Rojas A., Marshall G. Raloxifene is a better antioxidant of low-density lipoprotein than estradiol or tamoxifen in postmenopausal women in vitro. *Menopause* 2003; 10: 142–146.
22. Seli E., Selam B., Mor G., Kayisli U.A., Pehlivan T., Arici A. Estradiol regulates monocyte chemotactic protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells: A mechanism for its anti-atherogenic effect. *Menopause* 2001; 8: 296–301.
23. Seli E., Pehlivan T., Selam B., Garcia-Velasco J.A., Arici A. Estradiol down-regulates MCP-1 expression in human coronary artery endothelial cells. *Fertility and Sterility* 2002; 77: 542–547.
24. Simoncini T., De Caterina R., Genazzani A.R. Selective estrogen receptor modulators: Different actions on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 815–818.
25. Mori-Abe A., Tsutsumi S., Takahashi K. i wsp. Estrogen and raloxifene induce apoptosis by activating p38 mitogen-activated protein kinase cascade in synthetic vascular smooth muscle cells. *J. Endocrinol.* 2003; 178: 417–426.
26. Bjarnason N.H., Haarbo J., Byrjalsen I., Kauffman R.F., Christiansen C. Raloxifene inhibits aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized, cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1997; 96: 1964–1969.
27. Sanjuan A., Castelo-Branco C., Colodroń M. i wsp. Effects of estradiol, cyproterone acetate, tibolone and raloxifene on uterus and aorta atherosclerosis in oophorectomized cholesterol-fed rabbits. *Maturitas* 2003; 45: 59–66.
28. Choi B.G., Vilahur G., Zafar M.U. i wsp. Selective estrogen receptor modulation influences atherosclerotic plaque composition in a rabbit menopause model. *Atherosclerosis* 2008; 201: 76–84.
29. Barrett-Connor E., Ensrud K.E., Harper K. i wsp. Post hoc analysis of data from the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) trial on the effects of three years of raloxifene treatment on glycemic control and cardiovascular disease risk factors in women with and without type 2 diabetes. *Clin. Ther.* 2003; 25: 919–930.
30. De Valk-de Roo G.W., Stehouwer C.D.A., Meijer P. i wsp. Both raloxifene and estrogen reduce major cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women: A 2-year, placebo-controlled study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19: 2993–3000.
31. Cagnacci A., Paoletti A.M., Zanni A. i wsp. Raloxifene does not modify insulin sensitivity and glucose metabolism in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 4117–4121.
32. Andersson B., Johannsson G., Holm G. i wsp. Raloxifene does not affect insulin sensitivity or glycemic control in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus: A randomized clinical trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 122–128.
33. Lee C.C., Kasa-Vubu J.Z., Supiano M.A. Differential effects of raloxifene and estrogen on insulin sensitivity in postmenopausal women. *JAGS* 2003; 51: 683–688.
34. Cucinelli F., Soranna L., Romualdi D., Muzj G., Mancuso S., Lanzzone A. The effect of raloxifene on glyco-insulinemic homeostasis in healthy postmenopausal women: A randomized placebo-controlled study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 4186–4192.
35. Bayram M., Ozer G., Kalender H., Kabakci N., Kisa U., Ozkan Y. The effects of raloxifene and tibolone on homocysteine and vascular histopathological changes. *Clin. Exp. Med.* 2007; 7: 149–153.
36. Oktem M., Atar I., Zeyneloglu H.B., Yildirim A., Kuscu E., Muderrisoglu H. Raloxifene has favourable effects on metabolic parameters but has no effect on left ventricular function in postmenopausal women. *Pharmacol. Res.* 2008; 57: 364–368.
37. Taubes G. Does inflammation cut to the heart of the matter? *Science* 2002; 296: 242–245.

38. Ridker P.M. High-sensitivity C-reactive protein: Potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 2001; 103: 1813–1818.
39. Clearfield M.B. C-reactive protein: A new risk assessment tool for cardiovascular disease. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 2005; 105: 409–416.
40. Eilertsen A.L., Sandvik L., Steinsvik B., Sandset P.M. Differential impact of conventional-dose and low-dose postmenopausal hormone therapy, tibolone and raloxifene on C-reactive protein and other inflammatory markers. *J. Thromb. Haemost.* 2008; 6: 928–934.
41. Christodoulakos G.E., Lambrinouadaki I.V., Economou E.V. i wsp. Circulating chemoattractants RANTES, negatively related to endogenous androgens, and MCP-1 are differentially suppressed by hormone therapy and raloxifene. *Atherosclerosis* 2007; 193: 142–150.
42. Kumru S., Yildiz F.M., Godekmerdan A., Kutlu S., Yilmaz B., Gurates B. Effects of raloxifene and hormone replacement therapy on serum Th2 and Th3 type cytokine concentrations in healthy postmenopausal women: a randomised controlled trial. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2008; 277: 489–493.
43. Oztas E., Kurtay G. Randomized, controlled study of the effects of raloxifene on high sensitivity C-reactive protein and serum lipids. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2009 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20012308.
44. Oztas E., Kurtay G. Effects of raloxifene on serum macrophage colony-stimulating factor and interleukin-18 levels in postmenopausal women younger than 60 years. *Menopause* 2010; 17: 1188–1193.
45. Yasui T., Uemura H., Hyodo S. i wsp. Raloxifene reduces circulating levels of interleukin-7 and monocyte chemoattractant protein-1 in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2009; 204: 471–475.
46. Lee S.A., Park S.H., Kim B.C. Raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor-kappa B pathway in RAW264.7 macrophage cells. *Mol. Cells* 2008; 26: 48–52.
47. Lowe G., Woodward M., Vessey M., Rumley A., Gough P., Daly E. Thrombotic variables and risk of idiopathic venous thromboembolism in women aged 45–64 years. Relationships to hormone replacement therapy. *Thromb. Haemost.* 2000; 83: 530–535.
48. Scarabin P.Y., Vissac A.M., Kirzin J.M. i wsp. Population correlates of coagulation factor VII: Importance of age, sex, and menopausal status as determinants of activated factor VII. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16: 1170–1176.
49. Folsom A.R. Epidemiology of fibrinogen. *Eur. Heart J.* 1995; 16: 21–24.
50. Scarabin P.Y., Plu-Bureau G., Bara L., Bonithon-Kopp C., Guize L., Samama M.M. Haemostatic variables and menopausal status: Influence of hormone replacement therapy. *Thromb. Haemost.* 1993; 70: 584–587.
51. Meade T.W., Dyer S., Howarth D.J., Imeson J.D., Stirling Y. Antithrombin III and procoagulant activity: Sex differences and effects of the menopause. *Brit. J. Haematol.* 1990; 74: 77–81.
52. Hulley S., Grady D., Bush T. i wsp. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998; 280: 605–613.
53. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 321–333.
54. Walsh B.W., Kuller L.H., Wild R.A. i wsp. Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. *JAMA* 1998; 279: 1445–1451.
55. Nickelsen T., Creatsas G., Rechberger T. i wsp. Differential effects of raloxifene and continuous combined hormone replacement therapy on biochemical markers of cardiovascular risk: Results from the Euralox I study. *Climacteric* 2001; 4: 320–331.
56. Griffiths K.A., Sader M.A., Skilton M.R., Harner J.A., Celermajer D.S. Effects of raloxifene on endothelium-dependent dilation, lipoproteins, and markers of vascular function in postmenopausal women with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42: 698–704.
57. Nanetti L., Camilletti A., Francucci C.M. i wsp. Role of raloxifene on platelet metabolism and plasma lipids. *Eur. J. Clin. Invest.* 2008; 38: 117–125.
58. Mosca L., Grady D., Barrett-Connor E. i wsp. Effect of raloxifene on stroke and venous thromboembolism according to subgroups in postmenopausal women at increased risk of coronary heart disease. *Stroke* 2009; 40: 147–155.
59. Figtree G.A., Lu Y.Q., Webb C.M., Collins P. Raloxifene acutely relaxes rabbit coronary arteries in vitro by an estrogen receptor-dependent and nitric oxide-dependent mechanism. *Circulation* 1999; 100: 1095–1101.
60. Bracamonte M.P., Rud K.S., Miller V.M. Mechanism of raloxifene-induced relaxation in femoral veins depends on ovarian hormonal status. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002; 39: 704–713.
61. Simoncini T., Genazzani A.R., Liao J.K. Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation* 2002; 105: 1368–1373.
62. Chan Y.C., Leung F.P., Wong W.T. i wsp. Therapeutically relevant concentrations of raloxifene dilate pressurized rat resistance arteries via calcium-dependent endothelial nitric oxide synthase activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30: 992–999.
63. Leung F.P., Yung L.M., Leung H.S. i wsp. Therapeutic concentrations of raloxifene augment nitric oxide-dependent coronary artery dilatation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 2007; 152: 223–229.
64. Pinna C., Bolego C., Sanvito P. i wsp. Raloxifene elicits combined rapid vasorelaxation and long-term anti-inflammatory actions in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 319: 1444–1451.
65. Wassmann S., Laufs U., Stamenkovic D. i wsp. Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production. *Circulation* 2002; 105: 2083–2091.
66. Ogita H., Node K., Liao Y. i wsp. Raloxifene Prevents Cardiac Hypertrophy and Dysfunction in Pressure-Overloaded Mice. *Hypertension* 2004; 43: 237–242.
67. Ogita H., Node K., Asanuma H. i wsp. Amelioration of ischemia and reperfusion-induced myocardial injury by the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, in the canine heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40: 998–1005.
68. Chung M.T., Cheng P.Y., Lam K.K. i wsp. Cardioprotective effects of long-term treatment with raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on myocardial ischemia/reperfusion injury in ovariectomized rats. *Menopause* 2010; 17: 127–134.
69. Mack W.J., Dhungana B., Dowsett S.A. i wsp. Carotid artery intima-media thickness after raloxifene treatment. *J. Womens Health* 2007; 16: 370–378.

70. Dias A.R. Jr., de Mello N.R., Eluf Gebara O.C., Nussbacher A., Wajngarten M., Petti D.A. Conjugated equine estrogen, raloxifene and arterial stiffness in postmenopausal women. *Climacteric* 2008; 11: 390–396.
71. da Costa L.S., de Oliveira M.A., Rubim V.S. i wsp. Effects of hormone replacement therapy or raloxifene on ambulatory blood pressure and arterial stiffness in treated hypertensive postmenopausal women. *Am. J. Cardiol.* 2004; 94: 1453–1456.
72. Saitta A., Altavilla D., Cucinotta D. i wsp. Randomized, double-blind, placebo-controlled study on effects of raloxifene and hormone replacement therapy on plasma no concentrations, endothelin-1 levels, and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 1512–1519.
73. Colacurci N., Fornaro F., Cobellis L. i wsp. Raloxifene slows down the progression of intima-media thickness in postmenopausal women. *Menopause* 2007; 14: 879–884.
74. Chan Y.C., Leung F.P., Yao X., Lau C.W., Vanhoutte P.M., Huang Y. Raloxifene modulates pulmonary vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2007; 49: 355–361.
75. Duygu H., Akman L., Ozerkan F. i wsp. Comparison of the effects of new and conventional hormone replacement therapies on left ventricular diastolic function in healthy postmenopausal women: a Doppler and ultrasonic backscatter study. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* 2009; 25: 387–396.
76. Sumino H., Ichikawa S., Kasama S. i wsp. Effects of raloxifene on brachial arterial endothelial function, carotid wall thickness, and arterial stiffness in osteoporotic postmenopausal women. *Int. Heart J.* 2010; 51: 60–67.
77. Kawagoe J., Ohmichi M., Tsutsumi S., Ohta T., Takahashi K., Kurachi H. Mechanism of the divergent effects of estrogen on the cell proliferation of human umbilical endothelial versus aortic smooth muscle cells. *Endocrinology* 2007; 148: 6092–6099.
78. Vattikuti R., Towler D. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004; 286: E686–E696.
79. Sattler A., Schoppet M., Schaefer J., Hofbauer L. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif. Tiss. Int.* 2004; 74: 103–106.
80. Zagura M., Serg M., Kampus P. i wsp. Association of osteoprotegerin with aortic stiffness in patients with symptomatic peripheral artery disease and in healthy subjects. *Am. J. Hypertens.* 2010; 23: 586–5891.
81. Schoppet M., Preissner K., Hofbauer L. RANK ligand and osteoprotegerin. Paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 549–553.
82. Kaden J., Bickelhaupt S., Grobholz R. i wsp. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2004; 36: 57–66.
83. Price P.A., June H.H., Buckley J.R., Williamson M.K. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 1610–1616.
84. Morony S., Tintut Y., Zhang Z. i wsp. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr* (–/–) mice. *Circulation* 2008; 117: 411–420.
85. Hofbauer L.C., Schoppet M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet* 2001; 358: 257–259.
86. Grady D., Herrington D., Bittner V. i wsp. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 288: 49–57.
87. Messalli E.M., Mainini G., Scaffa C. i wsp. Raloxifene therapy interacts with serum osteoprotegerin in postmenopausal women. *Maturitas* 2007; 56: 38–44.
88. Fernández-García D., Muñoz-Torres M., Mezquita-Raya P. i wsp. Effects of raloxifene therapy on circulating osteoprotegerin and RANK ligand levels in post-menopausal osteoporosis. *J. Endocrinol. Invest.* 2008; 31: 416–421.
89. Bashir A., Mak Y.T., Sankaralingam S. i wsp. Changes in RANKL/OPG/RANK gene expression in peripheral mononuclear cells following treatment with estrogen or raloxifene. *Steroids* 2005; 70: 847–855.
90. Choi B.G., Vilahur G., Cardoso L. i wsp. Ovariectomy increases vascular calcification via the OPG/RANKL cytokine signalling pathway. *Eur. J. Clin. Invest.* 2008; 38: 211–217.
91. Osako M.K., Nakagami H., Koibuchi N. i wsp. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circ. Res.* 2010; 107: 466–475.
92. Wang T.H., Xiang Q.L., Chen J.W., Pan H., Cui Y.H. Raloxifene plus 17beta-estradiol inhibits proliferation of primary cultured vascular smooth muscle cells and human mammary endothelial cells via the janus kinase/signal transducer and activator of transcription3 cascade. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 561: 7–13.
93. Oviedo P.J., Hermenegildo C., Tarín J.J., Cano A. Raloxifene increases proliferation of human endothelial cells in association with increased gene expression of cyclins A and B1. *Fertil. Steril.* 2007; 88: 326–332.