

Antyoksydacyjne działanie estrogenów

Antioxidant activity of estrogens

Tomasz Stetkiewicz, Ireneusz Połać, Sławomir Jędrzejczyk, Grzegorz Stachowiak, Tomasz Pertyński

Wśród procesów zaangażowanych w patomechanizm procesu starzenia organizmu ludzkiego wymienia się m.in. udział reaktywnych form tlenu (wolnych rodników). Peroksydacja lipidów przez wolne rodniki jest czynnikiem szczególnie zaangażowanym w starzenie się komórek, a ponadto znacznie zwiększa aterosogenność lipoprotein. Poszukiwane są metody dostarczania do organizmu związków antyoksydacyjnych pod postacią diety bądź leków. Coraz większą uwagę poświęca się antyoksydacyjnemu działaniu estrogenów stosowanych w hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) u kobiet w okresie około- i pomenopauzalnym.

Słowa kluczowe: hormonalna terapia zastępcza, reaktywne formy tlenu, efekt antyoksydacyjny

(Przegląd Menopauzalny 2003; 2:19–22)

Wygaśnięcie czynności jajników i związany z tym deficyt hormonalny prowadzi do charakterystycznych objawów klinicznych, zaburzeń metabolicznych, zaburzeń ze strony układu krążenia, zmian w układzie kostno-stawowym i ośrodkowym układzie nerwowym oraz wzrostu częstości występowania niektórych nowotworów w okresie okołomenopauzalnym i pomenopauzalnym. Podejmowane są liczne badania, mające na celu wyjaśnienie mechanizmu efektów menopauzalnych w organizmie kobiety. Patomechanizm tych efektów pozostaje nadal problemem niewyjaśnionym do końca. Wśród procesów zaangażowanych w ten patomechanizm wymienia się: skracanie telomerów, starzenie się mitochondriów, akumulację mutacji, ekspresję *genów starości*, apoptozę doprowadzającą do atrofii tkanek, w tym tkanek narządów rozrodczych, a także udział wolnych rodników [1].

Peroksydacja lipidów przez wolne rodniki jest czynnikiem szczególnie zaangażowanym w starzenie się komórek [2]. Jest ona źródłem wtórnych wolnych rodników, które zaburzają funkcje komórek. Ponadto peroksydacja LDL znacznie zwiększa ich aterosogenność [3].

Zmniejszenie ich generacji może prowadzić do przedłużenia życia i okresu prawidłowej czynności komórek.

W okresie menopauzy wiele procesów degeneracyjnych jest związanych z układami estrogenozależnymi. Formą wyrównania niedoborów estrogenowych jest hormonalna terapia zastępcza. Wskazuje się na jej skuteczność profilaktyczną i terapeutyczną w bezpośrednich i odległych skutkach menopauzy. Przypuszczalnie u podstawy wielu z efektów działania HTZ leży antyoksydacyjny mechanizm działania estrogenów.

Antyoksydacyjne efekty działania estrogenów stanowią od lat przedmiot wielu badań.

Behl i wsp. [4] stwierdzili, że inkubacja linii H22 komórek hipokampa myszy z 17-beta-estradiolem zapobiega śmierci komórek, powodowanej przez stres oksydacyjny indukowany przez neurotoksyny.

Vibert i Okada [5] wykazali, że inkubacja ludzkich erytrocytów z 17-beta-estradiolem i estronem hamuje ich oksydacyjną hemolizę wywołaną przez chlorowodorek 2-amidynopropanu.

Wiseman i Quinn [6] tłumaczą antyoksydacyjny efekt estrogenów w błonach komórkowych utrzymaniem dzie-

Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi,
kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Tomasz Pertyński



ki odpowiedniemu potencjałowi redoks odpowiedniego stopnia *płynności* struktur błonowych.

Neugarten, Ghossein i Silbiger [7] wykazali zmniejszenie parametrów i markerów oksydacji LDL przez komórki mezangium nerki szczura po preinkubacji tych elementów z estradiolem.

Naturalna aktywność antyoksydacyjna estrogenów została zademonstrowana *in vitro* przy wykorzystaniu zjawiska peroksydacji fosfolipidów w błonach mikrosomów pochodzących z wątroby szczura. [8].

Kuhn-Velten i Pippirs [9] zastosowali również błony mikrosomalne, ale pochodzące z tkanek jądra szczura do badania wpływu hormonów steroidowych na indukowaną przez NADPH peroksydację lipidów, oznaczaną przy pomocy dialdehydu malonowego (MDA) (detekcja z udziałem TBARS), i inaktywację cytochromu P450. Stwierdzili, że wydajność antyoksydacyjna estradiolu jest wyższa niż cytochromu P450c17.

Ayres, Tang i Subbiah [10] wykazali w badaniach *in vitro*, że estradiol jest równie skutecznym antyoksydantem jak alfa-tokoferol wobec peroksydacji kwasów tłuszczowych.

Arteaga i wsp. [11], postulując antyoksydacyjne właściwości estrogenów jako wyjaśnienie kardioprotekcyjnego działania hormonalnej terapii zastępczej, badali wpływ estradiolu na oksydację lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Stwierdzono, że estradiol powodował zależne od dawki zmniejszenie generacji markera peroksydacji LDL – dialdehydu malonowego (MDA).

Yagi [12] wykazał podwyższony poziom nadtlenu lipidowych u myszy po obustronnej ovariectomii. Poziom ten ulegał obniżeniu po podaniu myszom estrogenów. Podobne obniżenie poziomu nadtlenu lipidowych u szczurów poddanych działaniu promieni gamma nastąpiło po iniekcjach z 2-hydroksyestradiolu.

Schroder i wsp. [13] potwierdzają również efekt antyoksydacyjny estrogenów zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. W układzie *in vitro* zaobserwowali oni, że 17-beta-estradiol zmniejszał oksydację izolowanych z krwi LDL. Oksydacja wywoływana była jonami miedzi, a jej markerem był czas oksydacji monitorowanej przy pomocy sprzężonych dienów. W pierwszym układzie *in vivo* grupie 21 królików po ovariectomii podawano przez 3 dni podskórnie 17-beta-estradiol, a następnie wywoływano oksydację LDL w próbkach krwi analogicznie do modelu *in vitro*. W drugim modelu *in vivo* u 11 kobiet pomenopauzalnych podawano HTZ, w której komponentą estrogenową był walerianian estradiolu podawany przez 21 dni, po których pobierano próbki krwi, celem badania oksydacji LDL. W obu układach *in vivo* stwierdzono wydłużenie czasu oksydacji LDL, w porównaniu z grupami kontrolnymi, świadczące o hamującym wpływie estrogenów na oksydację LDL.

Ruiz-Larrea i wsp. [14] udowodnili natomiast, że dodanie 17-beta-estradiolu (0–100 μ mol) do izolowanych

szczurzych hepatocytów przeciwdziała oksydacji lipidów komórkowych wywołanej przez kompleks Fe(III)/ADP.

Kim i wsp. [15] udowodnili natomiast protekcyjny wpływ estrogenów w mięśniu sercowym u psów i szczurów na uszkodzenia komórek, spowodowane przez wolne rodniki w czasie niedokrwienia/reperfuzji, co przejawiało się zmniejszoną generacją MDA i mniejszym spadkiem zawartości glutationu. Wyniki te potwierdzili McHugh, Merrill i Powell [16], którzy stwierdzili, że podanie skonjugowanych estrogenów psom wpływa hamująco na generację rodników hydroksylowych w mięśniu sercowym w czasie reperfuzji po wcześniejszym niedokrwieniu.

Yagi [12] stwierdził podwyższone poziomy nadtlenu lipidowych u kobiet poddanych obustronnej ovariectomii.

Tranquilli, Mazzanti i Cugini [17] oceniali wpływ hormonalnej terapii zastępczej na generację wolnych rodników w błonach płytek krwi kobiet w okresie około- i pomenopauzalnym. U 12 kobiet przez 25 dni zastosowali HTZ, której komponentą estrogenową był estradiol stosowany przezskórnie. Peroksydację lipidów oznaczali w próbkach krwi pobranych w 0., 12. i 25. dniu terapii za pomocą spektrofotometrycznej oceny generacji sprzężonych dienów. Stwierdzili zmniejszenie peroksydacji lipidów po włączeniu HTZ tym większe, im dłuższy był czas stosowania terapii.

Wnioski te potwierdzają badania przeprowadzone przez Sack, Rader i Cannon III [18], którzy oznaczali peroksydację LDL wywołaną jonami miedzi w próbkach krwi 18 kobiet otrzymujących HTZ w postaci iniekcji, a następnie w formie przezskórnej. Próbkę krwi pobierano w chwili 0, po iniekcji, po 3 tyg. terapii przezskórnej oraz po miesiącu od zakończenia terapii. Miara peroksydacji był również czas generacji sprzężonych dienów oznaczanych spektrofotometrycznie.

Działanie antyoksydacyjne estrogenów wobec peroksydacji LDL udowodnili również Wilcox i wsp. [19], stwierdzając w osoczu 8 kobiet otrzymujących doustnie estrogeny skonjugowane obniżenie poziomów LDL ulegających oksydacji i wydłużenie czasu oksydacji.

Według Clemente i wsp. [20] badających peroksydację LDL przy pomocy oznaczeń MDA (pomiaru TBARS) w grupie 13 kobiet otrzymujących 0,625 mg/dzień skoniugowanych estrogenów, hormony te nie zmniejszały endogennych poziomów LDL ulegających peroksydacji, a miały natomiast hamujący wpływ na peroksydację LDL wywoływaną przy pomocy jonów miedzi w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Hoogerbrugge i wsp. [21] badając 25 kobiet z hipercholesterolemią stosujących estrogenową terapię zastępczą, wykazali zmniejszenie ilości autoprzeciwciał skierowanych przeciw LDL, które uległy peroksydacji.

Według Sacksa, Gerharda i Walsha [22] do naczyniorozszerzającego działania estrogenów stosowanych w te-



terapii zastępczej dochodzi za pośrednictwem ich efektu antyoksydacyjnego. Okazało się, że ekspozycja endotelium bydlęcego na estrogeny (etynyloestradiol) poprzez hamowanie generacji anionu nadtlenkowego powoduje wzrost uwalniania NO przez endotelium, a zatem efekt naczyniorozszerzający [23].

Keller i wsp. [24] potwierdzili w swoich badaniach hipotezę, że estrogeny stosowane w HTZ u pacjentek z chorobą Alzheimera działają bezpośrednio na synapsy, znosząc w nich oksydacyjne upośledzenie transportu przez błonowego. Ustaliли oni, że ekspozycja synaptosomów z kory mózgowej szczura na 17-beta-estradiol lub estriol przeciwdziała upośledzeniu aktywności kompleksu błonowego Na⁺/K⁺-ATP-azy oraz transportu glukozy i glutaminianu przez oksydacyjne działanie beta-peptydu amyloidowego i jonów żelaza.

Venters i wsp. [25] z kolei postulują odmienne wyjaśnienie antyoksydacyjnej roli estrogenów w chorobie Alzheimera. Podają, że estrogeny chronią receptory muskarynowe w tkance nerwowej przed nieodwracalnym oksydacyjnym uszkodzeniem przez wolny hem, którego zawartość w mózgu osób dotkniętych tą chorobą zwiększona jest 3-krotnie.

Antyoksydacyjne działanie estrogenów w chorobie Alzheimera potwierdzili również w swoich badaniach Behl i wsp. [26]. Wykazali oni, że 17-beta-estradiol i jego pochodne mogą przeciwdziałać gromadzeniu się nadtlenu w przestrzeni międzykomórkowej, a w związku z tym degradacji neuronów początkowych i klonalnych komórek hipokampa.

Działanie antyoksydacyjne estrogenów jest postulowane nie tylko w chorobie Alzheimera, ale też w ostrych stanach dotyczących OUN. Badano warunki podobne do stresu oksydacyjnego w wylewie, urazie i niedokrwieniu tkanki nerwowej, wykazując wpływ estrogenów na zmniejszenie ubytków tkanki ekspozowanej na prooksydacyjne działanie hemoglobiny i oksydazy cytochromowej [27].

Większość z przytaczanych wyżej prac to badania prowadzone *in vitro*, wykorzystujące głównie jako markery generacji wolnych rodników uboczne produkty peroksydacji LDL, a mianowicie dialdehyd malonowy (MDA) oznaczany spektrofotometrycznie na podstawie

reakcji barwnej z barbituranami (TBARS) i skoniugowane dieny oznaczane elektroforetycznie lub też enzymy układu antyoksydacyjnego – katalazę, peroksydazę, dysmutazę, na podstawie ich aktywności. Szczególnie obiecującą metodą jest bezpośrednie badanie generacji wolnych rodników przez ludzkie neutrofile przy zastosowaniu pomiaru chemiluminescencji towarzyszącej tej generacji.

Olinescu i wsp. [28] badając wpływ estronu na generację wolnych rodników przez ludzkie neutrofile przy wykorzystaniu chemiluminescencji stwierdzili, że przy stężeniach mniejszych od 10⁻⁵ moli/l estron zwiększał generację wolnych rodników, a przy stężeniach większych hamował ją.

Z kolei Pertyńska i wsp. [29] w badaniach *in vitro* nad preparatem zawierającym walerianian estradiolu, estradiol i lewonorgestrel stwierdzili, że powodował on średni spadek generacji reaktywnych form tlenu o 25% zarówno przez neutrofile spoczynkowe, jak i stymulowane fMLP, PMA i zymosanem. W badaniach *in vivo* w grupie 20 kobiet okołomenopauzalnych ten sam preparat spowodował obniżenie generacji wolnych rodników średnio o 21%.

Metoda chemiluminescencji została wykorzystana również w badaniach własnych [30]. U kobiet w okresie pomenopauzalnym już po 3 mies. stosowania HTZ stwierdzono statystycznie istotne zmniejszenie generacji reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej. Dotyczyło to zarówno generacji spontanicznej, jak i po zastosowaniu standardowych stymulatorów – formylo-metionilo-leucylofenyloalaniny (fMLP), octanu mirystynianu forbolu (PMA) i zymosanu.

Jak wynika z analizy piśmiennictwa estrogeny spełniają istotną rolę w równowadze oksydoredukcyjnej komórek organizmu. Przytoczone prace dostarczają dowodów świadczących o aktywności estrogenów jako związków zwiększających potencjał antyoksydacyjny organizmu, a więc przeciwdziałających szkodliwemu działaniu wolnych rodników przyspieszającemu proces starzenia. Rzuci to nowe światło na pozytywne efekty hormonalnej terapii zastępczej.

Summary

The activity of reactive oxygen intermediates (free radicals) is one of the mechanisms of the ageing process. In particular, lipid peroxidation is the main factor of cells ageing and makes lipoproteins more atherogenic. There are still many studies on prophylactic administration of antioxidant substances as a diet or drugs.

At present more and more attention is paid to the antioxidant effect of estrogens, administered as part of hormonal replacement therapy in peri- and postmenopausal women.

Key words: hormonal replacement therapy, reactive oxygen intermediates



Piśmiennictwo

1. Bowles JT. *The evolution of ageing: a new approach to an old problem of biology*. Med Hypotheses 1998; 51 (3): 179-221.
2. Rice-Evans C, Bruckdorfer KR. *Free radicals, lipoproteins and cardiovascular dysfunction*. Mol Aspects Med 1992; 13: 1-11.
3. Witztum JL. *The oxidation hypothesis of atherosclerosis*. Lancet 1994; 344: 915-24.
4. Behl C, Widmann M, Trapp T, et al. *17 beta estradiol protect neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro*. Biochem Biophys Res Commun 1995; 216 (2): 473-82.
5. Vibert-Li JL, Okada S. *Inhibitory effect of estrogens on the oxidative hemolysis induced by 2-amidinopropane hydrochloride, a free radical generator*. Acta Med. Okayama 1996; 50 (3): 125-30.
6. Wiseman H, Quinn P. *The antioxidant action of synthetic oestrogens involves decreased membrane fluidity: relevance to their potential use as anticancer and cardioprotective agents compared to tamoxifen?* Free Rad Res 1994; 21 (3): 187-94.
7. Neugrten J, Ghossein C, Silbiger S. *Estradiol inhibits mesangial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein*. J Lab Clin Med 1995; 126 (4): 385-91.
8. Takanashi K, Watanabe K, Yoshizawa I. *On the inhibitory effect of C17-sulfoconjugated catechol estrogens upon lipid peroxidation of rat liver microsomes*. Biol Pharm Bull 1995; 18 (8): 1120-5.
9. Kuhn-Velten WN, Pippirs U. *Novel connections between NADPH-induced lipid peroxidation, and antioxidant and enzyme protective properties of estradiol in gonadal membranes*. Free Radic Res 1997; 26 (2): 125-33.
10. Ayres S, Tang M, Subbiah MT. *Estradiol-17beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants*. J Lab Clin Med 1996; 128 (4): 367-75.
11. Arteaga E, Villaseca P, Rojas A, et al. *Comparison of the antioxidant effect of estradiol and estradiol on low density lipoproteins in post-menopausal women*. Rev Med Chil 1998; 126 (5): 481-7.
12. Yagi K. *Female hormones act as natural antioxidants – a survey of our research*. Acta Biochem Pol 1997; 44 (4): 701-9.
13. Schroder J, Doren M, Schneider B, et al. *Are the antioxidative effects of 17beta-estradiol modified by concomitant administration of a progestin*. Maturitas 1996; 25 (2): 133-9.
14. Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Martin C, et al. *Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes*. Rev. Esp. Fisiol. 1997; 53 (2): 225-9.
15. Kim YD, Farhat MY, Myers AK, et al. *17-Beta estradiol regulation of myocardial glutathione and its role in protection against myocardial stunning in dogs*. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1998; 32 (3): 457-65.
16. McHugh NA, Merrill GF, Powell SR. *Estrogen diminishes postischemic hydroxyl radical production*. Am J Physiol 1998; 274 (6 Pt 2): H1950-1954.
17. Tranquilli AL, Mazzanti L, Cugini M. *Transdermal estradiol and medroxyprogesterone acetate in hormone replacement therapy are both antioxidants*. Gynecol Endocrinol 1995; 9: 137-41.
18. Sack MN, Rader DJ, Cannon III RO. *Estrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women*. Lancet, 1994; 343: 269-70.
19. Wilcox JG, Hwang J, Hodis HN, et al. *Cardioprotective effects of individual conjugated equine estrogens through their possible modulation of insulin resistance and oxidation of low-density lipoprotein*. Fertil Steril 1997; 67 (1): 57-62.
20. Clemente C, Caruso MG, Berloco P, et al. *Antioxidant effect of short-term hormonal treatment in postmenopausal women*. Maturitas 1999; 31: 137-42.
21. Hoogerbrugge N, Zillikens MC, Jansen H, et al. *Estrogen replacement decreases the level of antibodies against oxidised low-density lipoprotein in postmenopausal women with coronary heart disease*. Metabolism 1998; 47 (6): 675-80.
22. Sacks FM, Gerhard M, Walsh BW. *Sex hormones, lipoproteins and vascular reactivity*. Curr Opin Lipidol 1995; 6 (3): 161-6.
23. Arnal JF, Clamens S, Pechet C, et al. *Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93 (9): 4108-13.
24. Keller JN, Germeyer A, Begley JGAD. *17Beta-estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na⁺/K⁺-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid beta-peptide and iron*. J Neurosci Res 1997; 50 (4): 522-30.
25. Venters HD Jr, Bonilla LE, Jensen T, et al. *Heme from Alzheimer's brain inhibits muscarinic receptor binding via thiyl radical generation*. Brain Res 1997; 764 (1-2): 93-100.
26. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, et al. *Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship*. Mol Pharmacol 1997; 51 (4): 535-41.
27. Regan RF, Guo Y. *Estrogens attenuate neuronal injury due to hemoglobin, chemical hypoxia, and excitatory amino acids in murine cortical cultures*. Brain Res 1997; 764 (1-2): 133-40.
28. Olinescu R, Hertoghe J, Savoie D, et al. *Steroid hormones may modulate the chemiluminescence emission produced by polymorphonuclear leukocytes*. Rom J Intern Med 1994; 32 (1): 37-46.
29. Pertyńska M, Tchórzewski H, Lewkowicz P, et al. *Hormonalna terapia zastępcza u kobiet w okresie okołomenopauzalnym a generacja wolnych rodników tlenowych przez neutrofile krwi obwodowej*. W: Menopauza (Pertyński T, red.) Łódź: ADI 1999: 71-7.
30. Stetkiewicz T. *Wpływ hormonalnej terapii zastępczej u kobiet w wieku pomenopauzalnym na wybuch tlenowy neutrofili mierzony metodą chemiluminescencji*. Praca doktorska, 1999 WAM Łódź.

Adres do korespondencji

dr n. med. Tomasz Stetkiewicz
Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki
Rzgowska 281/289
93-338 Łódź

