Wpływ stosowania doustnej hormonalnej terapii na kinetykę procesów: tworzenia skrzepu i fibrynolizy kobiet w wieku okołomenopauzalnym

The effects of oral hormone therapy in menopausal women on plasma fibrin polymerization and lysis

Marta Borowiecka[1], Ireneusz Połać[2], Bogdan Kontek[1], Paweł Nowak[1], Tomasz Pertyński[2]

[1]Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki
Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. przyr. Barbara Wachowicz
[2]Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Tomasz Pertyński

Przegląd Menopauzalny 2010; 2: 91–94

Streszczenie

Wstęp: Z okresem menopauzy wiążą się niekorzystne zmiany w układzie hemostazy kobiet, niosące ze sobą zwiększone ryzyko zapadalności na choroby układu krążenia. W leczeniu schorzeń wieku menopauzalnego coraz powszechniej stosuje się terapię hormonalną (HT). Jednym z najbardziej niebezpiecznych działań niepożądanych ww. terapii są powikłania zakrzepowo-zatorowe. Doustne środki hormonalne mogą prowadzić do prozakrzepowych zmian w układzie hemostazy, nawet 3-krotnie zwiększając ryzyko powikłań. Terapia hormonalna istotnie wpływa na metabolizm i strukturę białek uczestniczących w procesach krzepnięcia i fibrynolizy.

Cel pracy: Celem badań było określenie wpływu długotrwałego stosowania HT na kinetykę procesów polimeryzacji osocza oraz lizy włóknika poprzez badanie ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy u kobiet w wieku okołomenopauzalnym.

Materiał i metody: Materiałem było świeżo mrożone osocze kobiet nieprzyjmujących środków hormonalnych (kontrola), a także stosujących HT (grupa badana). Do badań stosowano trombinę o końcowym stężeniu 0,5 j/ml oraz tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) o ostatecznym stężeniu 60 ng/ml. Rejestrowano zmiany absorbancji w czasie przy użyciu programu kinetycznego przez 55 min przy długości fali $\lambda = 415$ nm.

Wyniki: Długotrwałe stosowanie HT złożonej z estrogenów i gestagenów przyczynia się do istotnych zmian w kinetyce zarówno polimeryzacji osocza, jak i lizy włóknika. Przeprowadzone badania wykazały znaczne przyspieszenie procesu tworzenia skrzepu oraz silne zahamowanie jego lizy u kobiet przyjmujących HT w stosunku do grupy kontrolnej. Oceny powyższych zmian dokonano na podstawie wartości szybkości maksymalnej polimeryzacji oraz czasu, w którym nastąpiła połowiczna liza włóknika. Zjawisko to może być wynikiem formowania się skrzepu o nieprawidłowej strukturze, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania lizy włóknika, czego następstwem są powikłania zakrzepowo-zatorowe.

Słowa kluczowe: terapia hormonalna, hemostaza, krzepnięcie, fibrynoliza, menopauza.

Summary

Objectives: Hormone therapy (HT) is more and more universally applied in treatment of menopausal age complaints. Thrombotic-embolic diseases are among the most dangerous and undesirable complications of HT. Hormones can lead to pro-thrombotic changes and the risk of thrombosis and its complications may be even 3-fold increased. Hormone therapy influences the metabolism of proteins participating in processes of clotting and lysis. The purpose of the research was to determine the long-term influence of HT on the kinetics of plasma fibrin polymerization and lysis in postmenopausal women.

Material and methods: The material was fresh frozen plasma from 64 menopausal women either taking HT for 12 months (study group, $n = 32$) or with no treatment (controls, $n = 32$). For experiments thrombin was applied at the final concentration of 0.5 U/ml and tissue plasminogen activator (t-PA) at the final concentration of 60 ng/ml. Changes of turbidity were registered with a kinetic program for 55 minutes at $\lambda = 415$ nm. The maximum velocity of polymerization and half time of fibrin lysis were calculated.

Adres do korespondencji:
Marta Borowiecka, Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Results: Long-term HT treatment caused changes of fibrin plasma polymerization and fibrin lysis. The parameters of coagulation were increased and significant inhibition of lysis was noted in the women taking HT.

Conclusions: 12 months of oral hormone therapy resulted in increased initial velocity of clot formation and inhibition of fibrinolysis. The increased level of fibrinogen and its higher polymerization may partly explain the increase in venous thrombosis and cardiovascular events reported after the use of combined hormone therapy.

Key words: hormone therapy, haemostasis, coagulation, fibrinolysis, menopause.

W leczeniu dolegliwości i schorzeń wieku menopauzalnego coraz częściej stosuje się hormonalną terapię (HT), która ma na celu wyeliminowanie lub złagodzenie niepożądanych skutków klimakterium [1]. Znany powszechnie fakt, że doustne środki hormonalne powodują prozakrzepowe zmiany w układzie krzepnięcia i fibrynolizy, przyczynił się do podjęcia badań nad wpływem HT na hemostazę ustrojową. Z opublikowanych w ostatnich latach prac wynika, iż podczas stosowania preparatów hormonalnych ryzyko powikłań zakrzepowo-zatorowych wzrasta 2–3-krotnie, zwłaszcza w pierwszych 6–12 mies. terapii [2, 3]. Przyjmowanie środków hormonalnych wpływa także na metabolizm oraz strukturę białek uczestniczących w procesach krzepnięcia i fibrynolizy [4–6]. To właśnie przesunięcie równowagi w kierunku nadkrzepliwości było jedną z przyczyn podjęcia badań nad wpływem stosowania doustnej suplementacji hormonalnej (złożonej z 17β-estradiolu oraz dydrogesteronu) na kinetykę tworzenia skrzepu i lizy włóknika u kobiet menopauzalnych.

Prowadzone doświadczenia koncentrowały się na wyznaczeniu wybranych parametrów kinetycznych poprzez badanie całkowitego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy [7]. Wśród oznaczanych parametrów znalazły się: prędkość maksymalna polimeryzacji osocza, czas trwania połowicznej lizy włóknika oraz moment utworzenia w pełni ustabilizowanego skrzepu (określany jako absorbancja maksymalna). Uzyskane wartości pomogły w określeniu wpływu doustnej hormonalnej terapii na szybkość formowania się skrzepu oraz jego lizy.

Cel pracy

Celem podjętych badań było określenie wpływu długotrwałego stosowania (12 mies.) doustnej hormonalnej terapii złożonej z 17β-estradiolu oraz dydrogesteronu na przebieg procesów: tworzenia skrzepu oraz lizy włóknika w osoczu kobiet okołomenopauzalnych.

Materiał i metody

W badaniu wzięły udział 64 kobiety w wieku około- i pomenopauzalnym, będące pacjentkami Kliniki Ginekologii i Chorób Menopauzy oraz Poradni Menopauzy Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Grupę badaną stanowiły 32 pacjentki, pozostałe zaś ustanowiły grupę kontrolną. Średni wiek kobiet wynosił 54,2 roku. Wskazaniami do rozpoczęcia leczenia były objawy zespołu klimakterycznego, zaś kryteriami wykluczającymi: istnienie przeciwwskazań do hormonalnej terapii, ostre lub przewlekłe choroby zapalne, nowotwory, cukrzyca, stosowanie leków o właściwościach antyoksydacyjnych bądź antykoagulacyjnych. Pacjentki z grupy badanej zostały zakwalifikowane do doustnej ciągłej estrogenowo-gestagenowej terapii i stosowały ją przez okres minimum 12 mies. Kobiety należące do grupy kontrolnej nie przyjmowały żadnych środków hormonalnych. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy ICZMP w Łodzi (nr RNN/57/06/KE).

U wszystkich kobiet przed rozpoczęciem terapii wykonano: badanie ginekologiczne połączone z cytologiczną oceną pochwowej części szyjki macicy, przezpochwowe ultrasonograficzne badanie narządów rodnych, palpacyjne badanie piersi oraz mammografię. We krwi pacjentek oznaczono pełną morfologię, stężenie glukozy na czczo, stężenie cholesterolu i triglicerydów. U każdej kobiety pobrano także 5 ml krwi w celu określenia następujących elementów układu krzepnięcia i fibrynolizy:

- płytki krwi (PLT) – przy użyciu aparatu Baker 810,
- czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) – Pathromtin SL firmy Dade-Behring,
- stężenie fibrynogenu (Fg) – odczynnik Multifibren U firmy Dade-Behring.

Krew pobierana była do dwóch probówek zawierających 550 µl 3,8-proc. cytrynianu sodowego – do każdej probówki pobrano 5 ml krwi (stosunek między cytrynianem sodu a krwią wynosił 1 : 9). U kobiet z grupy badanej zastosowano 12-miesięczną doustną hormonalną terapię złożoną z 17β-estradiolu (E_2 1 mg/dobę) oraz dydrogesteronu (5 mg/dobę) przez 28 dni cyklu. Efekt działania opisywanych preparatów określono poprzez porównanie wybranych elementów układu hemostazy oraz parametrów kinetycznych procesu tworzenia skrzepu i fibrynolizy w grupie kontrolnej (nieprzyjmującej HT) oraz badanej (zażywającej HT). Do wywołania procesu polimeryzacji stosowano trombinę o końcowym stężeniu 0,5 j/ml, zaś w celu wzbudzenia fibrynolizy użyto tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) o ostatecznym stężeniu 60 ng/ml. Zasada metody, którą wykorzystano, opiera się na pomiarze zmian natężenia światła przechodzącego przez studzienkę zawierającą 3-krotnie rozcieńczone osocze. Po dodaniu trombiny procesowi formowania skrzepu fibrynowego towarzyszy zmniejszenie natężenia światła przepuszczanego przez badany materiał, co wyraża się rosnącymi wartościami absorbancji. Moment powstania w pełni ustabilizowanego skrzepu widoczny jest jako maksimum

absorbancji, czyli osiągnięcie przez wykres *plateau*. W kolejnym etapie dodany przed pomiarem t-PA aktywuje proces fibrynolizy utworzonego skrzepu, czemu towarzyszy zmniejszenie wartości absorbancji aż do osiągnięcia linii podstawowej sprzed pomiaru. Badania ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy dokonano przy użyciu czytnika mikropłytek BIO-RAD 550. Rejestrowano zmiany w czasie absorbancji od momentu dodania trombiny przy użyciu programu kinetycznego (Microplate Manager 4.0.) przez 55 min przy długości fali λ = 415 nm. W ciągu tego czasu czytnik dokonał 132 pomiarów. Każdą serię wykonywano na próbkach świeżo mrożonego osocza, powtarzając czterokrotnie dla każdej pacjentki. Badania wykonywano przy stałej temperaturze 20°C. Próbki, które oceniano, zawierały:

a) 300 µl osocza trzykrotnie rozcieńczonego roztworem TBS-u (buforowany Tris-HCl fizjologiczny roztwór soli),
b) 60 µl trombiny wołowej 400 firmy BIO_MED o ostatecznym stężeniu 0,5 j/ml,
c) tkankowy aktywator plazminogenu (preparat handlowy Actilyse 20 firmy Boehringer Ingelheim) o końcowym stężeniu 60 ng/ml.

Na podstawie wyników pomiarów wyznaczono następujące parametry:

1) szybkość maksymalna polimeryzacji,
2) czas połowicznej lizy włóknika,
3) absorbancja maksymalna.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono wyniki wpływu stosowania doustnej terapii hormonalnej na wartości wybranych parametrów polimeryzacji osocza i lizy włóknika.

Zaobserwowano, iż długotrwałe stosowanie doustnej hormonalnej terapii złożonej z estrogenów i gestagenów przyczynia się do niekorzystnych zmian w kinetyce zarówno procesu polimeryzacji, jak i lizy włóknika w osoczu pacjentek. Przeprowadzone wstępne badania wskazują na znaczne przyspieszenie procesu formowania skrzepu oraz silne zahamowanie jego lizy u kobiet stosujących doustne środki hormonalne w porównaniu z grupą kontrolną. Oceny powyższych zmian dokonano na podstawie wartości szybkości maksymalnej polimeryzacji, a także długości trwania czasu połowicznej lizy włóknika (był on prawie dwukrotnie dłuższy w grupie pacjentek z HT). Wyższe wartości maksymalnej absorbancji odnotowano u kobiet przyjmujących środki hormonalne.

Dla parametrów wyrażonych w skali przedziałowej (ciągłych) podano minimum i maksimum, obliczono średnią, medianę, odchylenie standardowe, standardowy błąd średniej i współczynnik zmienności. Sprawdzono normalność rozkładów testem Shapiro-Wilka. Porównanie średnich między grupami w przypadku nieodrzucenia hipotezy o normalności rozkładu na poziomie istotności $p = 0,05$ wykonano testem *t*-Studenta dla prób niezależnych względem zmiennej (APTT, liczba płytek krwi, czas 50% lizy), a w przypadku odrzucenia hipotezy o normalności rozkładów (stężenie Fg, prędkość maksymalna polimeryzacji, absorbancja maksymalna) stosowano nieparametryczny test *U* Manna-Whitneya.

Zaobserwowano znamienną statystycznie różnicę w średnim stężeniu fibrynogenu oraz APTT w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną: 3,12 g/l *vs* 4,24g/l ($p < 0,001$); APTT: 27,18 s *vs* 31,08 s ($p = 0,02$). W grupie badanej znamienne statystycznie różnice dotyczą także wartości szybkości maksymalnej polimeryzacji w porównaniu z grupą kontrolną: 95,84 mOD/min *vs* 146,50 mOD/min ($p < 0,001$), wartości absorbancji maksymalnej 0,279 *vs* 0,312 ($p < 0,001$) oraz czasu połowicznej lizy włóknika z 17,16 min na 31,43 min ($p < 0,001$). Nie było różnic znamiennych statystycznie pomiędzy liczbą płytek w grupie kontrolnej i badanej. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że u kobiet w wieku okołomenopauzalnym stosowanie terapii hormonalnej opartej na doustnych preparatach powoduje zwiększenie tempa powstawania skrzepu, a także hamowanie procesu fibrynolizy. Zjawisko to może być wynikiem prozakrzepowego działania estrogenów, jednak wpływ hormonoterapii na czynność układu hemostazy jest procesem bardzo złożonym i wielokierunkowym.

Dyskusja

Jednym z najbardziej niebezpiecznych działań niepożądanych u kobiet stosujących doustne preparaty hormonalne są powikłania zakrzepowo-zatorowe [8, 9].

W badaniu autorów podczas 12-miesięcznej HT obserwowane było zwiększenie stężenia fibrynogenu; może to być związane ze zwiększoną lepkością krwi, co utrudnia jej przepływ w naczyniu krwionośnym [10]. W badaniu

Tab. I. Wyniki wpływu stosowania doustnej terapii hormonalnej na wartości wybranych parametrów polimeryzacji osocza i lizy włóknika

Parametr	Parametry stystyczne	Grupa kontrolna	Grupa badana
V_{max} polimeryzacji [mOD/min]	średnia ± odch. std.	95,84 ±5,12	146,50 ±8,32
czas 50% lizy [min]	średnia ± odch. std.	17,16 ±3,18	31,43 ±11,62
A_{max}	średnia ± odch. std.	0,279 ±8,31	0,312 ±12,42
stężenie Fg [g/l]	średnia ± odch. std.	3,12 ±1,12	4,24 ±1,28
liczba płytek krwi	średnia ± odch. std.	253.000 ±72,7	238.000 ±70,8
APTT [s]	średnia ± odch. std.	27,18 ±2,33	31,08 ±3,41

Leiden Thrombophilia Study (LETS) wykazano dodatnią korelację między podwyższonym stężeniem fibrynogenu a ryzykiem żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej [11]. Zatem podwyższone stężenie tego białka może stanowić jedną z przyczyn zwiększenia szybkości procesu formowania skrzepu [12].

Innym powodem przyspieszenia procesu polimeryzacji osocza u pacjentek stosujących HT jest trombogenne działanie progestagenów, wchodzących w skład suplementacji hormonalnej. Opisywane środki prowadzą także do osłabienia fibrynolizy, którą również obserwuje się w grupie badanej. Przyczyną utrudnionej lizy skrzepów może być nieprawidłowa struktura tworzonego włóknika. Cienkie i ściśle upakowane włókna fibryny są mniej dostępne dla czynników fibrynolitycznych. Skrzepy w ten sposób zbudowane nie mogą zostać sprawnie usunięte przez system fibrynolityczny. Takie upośledzone usuwanie skrzepów może stać się przyczyną zakrzepicy [13].

Prawdopodobny w zahamowaniu lizy włóknika wydaje się także udział inhibitora fibrynolizy aktywowanego przez trombinę (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* – TAFI), który ma zdolność odszczepiania C-końcowych reszt lizyny z fibryny, co z kolei prowadzi do osłabienia fibrynolizy. Jak bowiem wiadomo, lizyny C-końcowe w fibrynie są niezbędne do przyłączania plazminogenu oraz t-PA [14, 15], a zatem udział tej karboksypeptydazy może być istotny. Enzym ten osłabia więc kofaktorową aktywność fibryny w aktywacji plazminogenu [16].

Powstający w ten sposób włóknik ma nietypową strukturę, co w efekcie może doprowadzić do zatorów w układzie sercowo-naczyniowym lub innych schorzeń układu krążenia towarzyszących okresowi menopauzy [17].

Detekcja i redukcja czynników ryzyka sercowo-naczyniowego winna być jednym z podstawowych elementów kwalifikacji do HT oraz monitorowania kobiet podczas terapii. W przypadku istnienia choroby układu krążenia kluczowe jest jej właściwe leczenie. Istotny dla bezpieczeństwa naczyniowego jest wybór właściwej drogi podania terapii hormonalnej (ważny m.in. ze względu na możliwe przeciwwskazania), nie ma natomiast wątpliwości, że optymalną formą leczenia skutków klimakterium jest niskodawkowa terapia hormonalna wieku menopauzalnego [18].

Wnioski

Długotrwałe stosowanie doustnej terapii hormonalnej powoduje znaczne przyspieszenie procesu tworzenia skrzepu, a także silne zahamowanie jego lizy u kobiet w wieku okołomenopauzalnym. Złożona HT może być również przyczyną formowania się włóknika o nieprawidłowej strukturze, co w konsekwencji prowadzi do zwolnionej lizy skrzepu badanych pacjentek.

Piśmiennictwo

1. Farquhar C, Marjoribanks J, Lethaby A, et al. Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. Cochrane Database Syst Rev 2009; 2: CD004143.
2. Peruga J, Kopff A, Krzemińska-Pakuła M. Hormone replacement therapy. The cardiologist's point of view. Prz Menopauz 2007; 1: 3-7.
3. Sumino H, Ichikawa S, Sawada Y, et al. Effects of hormone replacement therapy on blood coagulation and fibrinolysis in hypertensive and normotensive postmenopausal women. Thromb Res 2005; 115: 359-66.
4. Miller VM, Jayachandran M, Heit JA, et.al. Estrogen therapy and thrombotic risk. Pharmacol Ther 2006; 111: 792-807.
5. Norris LA, Brosnan J, Bonnar J, et al. Inhibitors and activation markers of the haemostatic system during hormone therapy: a comparative study of oral estradiol (2 mg)/dydrogesterone and estradiol (2 mg)/trimegestone. Thromb Haemost 2008; 100: 253-60.
6. Simomcini T, Mannella P, Genazzani AR. When hormone therapy sneaks under your nose. Menopause 2008; 15: 215-6.
7. Kostka B, Para J, Sikora J. A multiparameter test of clot formation and fibrinolysis for in-vitro drug screening. Blood Coagulation and Fibrinolysis 2007; 18: 611-8.
8. Barczyński B, Kotarski J. Hormonal therapy and thromboembolic disease. Prz Menopauz 2008; 3: 127-31.
9. Junge W, El Samalouti V, Gerlinger C, et al. Effects of menopausal hormone therapy on hemostatic parameters, blood pressure, and body weight: open-label comparison of randomized treatment with estradiol plus drospirenone versus estradiol plus norethisterone acetate. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; 147: 195-200.
10. Rosendaal FR, Reitsma PH. Genetics of venous thrombosis. J Thromb Haemost 2009; 7 (Suppl. 1): 301-4.
11. Koster T, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al. Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. A case-control study of plasma levels and DNA polymorphisms – the Leiden Thrombophilia Study (LETS). Thromb Haemost 1994; 71: 719-22.
12. Kostka T, Para J, Kostka B. Correlates of plasma fibrinogen (FG) levels in a random sample of community-dwelling elderly. Arch Gerontol Geriatrics 2008; 46: 211-20.
13. Parastatidis I, Thomson L, Burke A, et al. Fibrinogen beta-chain tyrosine nitration is a prothrombotic risk factor. J Biol Chem 2008; 283: 33846-53.
14. Marx PF. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. Curr Med Chem 2004; 11: 2335-48.
15. Bouma BN, Marx PF, Mosnier LO, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). Thromb Res 2001; 101: 329-54.
16. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis. Pathophysiol Haemost Thromb 2003; 33: 375-81.
17. Bhasin N, Ariens RA, West RM, et al. Altered fibrin clot structure and function in the healthy first-degree relatives of subjects with intermittent claudication. J Vasc Surg 2008; 48: 1497-503.
18. Stachowiak G, Pertyński T. Cardiologic safety of menopausal hormone therapies. Prz Menopauz 2009; 6: 1-5.