

Wpływ przezskórnej estrogenoterapii na produkcję interleukiny-6 u kobiet w wieku pomenopauzalnym

Effects of transdermal oestrogen replacement therapy on interleukin-6 production in postmenopausal women

Dominik Rachoń¹, Łukasz Hak¹, Krystyna Suchecka-Rachoń², Jolanta Myśliwska¹

Estrogeny posiadają właściwości przeciwmiażdżycowe, jednak dokładne mechanizmy tego działania nie zostały w pełni poznane. Miażdżycy w ostatnich latach zyskała miano przewlekłej choroby zapalnej, w której znaczącą rolę odgrywa zaburzenie homeostazy cytokin, w tym także interleukiny-6 (IL-6). Celem naszej pracy było zbadanie wpływu przezskórnej estrogenoterapii na produkcję IL-6 u kobiet w wieku pomenopauzalnym. Do badań zostało zakwalifikowanych 50 zdrowych kobiet w wieku pomenopauzalnym, wśród których wyodrębniono 2 grupy. W grupie I znalazły się kobiety, które wyraziły chęć poddania się hormonalnej terapii zastępczej (grupa HTZ), natomiast w grupie II pacjentki, które nie wyraziły zgody na tego typu leczenie (grupa kontrolna). W surowicy oraz w nadsączach z nadciśnieniem krwi obwodowej wyizolowanych z krwi żyłnej, zostały oznaczone wyjściowe oraz po 6. i 12. mies. obserwacji, poziomy bioaktywnej IL-6 metodą biologiczną. Po 12. mies. obserwacji, poziomy IL-6 w surowicy kobiet z „grupy HTZ” znacznie się obniżył i był znacząco niższy w porównaniu do grupy kontrolnej. Produkcja IL-6 przez niestymulowane jednojądrzaste komórki krwi obwodowej kobiet przyjmujących HTZ także uległa zmniejszeniu w porównaniu do wartości wyjściowych. Podsumowując wyniki naszych badań, można stwierdzić, iż przezskórna estrogenoterapia zmniejsza produkcję IL-6 u kobiet w wieku pomenopauzalnym, co może być jednym z pośrednich mechanizmów przeciwmiażdżycowego działania estrogenów.

*Hasła przedmiotowe: interleukina-6, estrogeny, miażdżycy, menopauza, HRT, cytokiny.
(Przegląd Menopauzalny 2002, 2: 23–27)*

Wstęp

Wyniki wielu badań wykazały, że estrogeny posiadają właściwości przeciwmiażdżycowe, jednak dokładne mechanizmy tego działania nie zostały w pełni

poznane [2, 3, 4]. Miażdżycy w ostatnich latach zyskała miano przewlekłej choroby zapalnej [16], czego dowodem jest obecność nacieków komórek układu odpornościowego (makrofagów, limfocytów) w blaszkach miażdżycowych [8] oraz obecność markerów stanu zapalne-

¹ Zakład Immunologii, Katedra Histologii i Immunologii AM w Gdańsku, kierownik: prof. dr hab. Jolanta Myśliwska,

² Katedra Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii AM w Gdańsku, kierownik: prof. dr hab. Bogdan Wyrzykowski



Tab. I. Porównanie kobiet z obydwu grup na początku badania

	Grupa HTZ n=30	Grupa kontrolna n=20
wiek (lata)	51,75±5,09	52,91±4,6
czas od ostatniej miesiączki (lata)	3,1±3,87	3,78±6,03
BMI	25,85±2,97	27,89±5,68
palenie papierosów (%)	11 (37%)	7 (35%)
poziomy FSH w surowicy (IU/L)	68,69±27,54	69,84±20,04
poziomy 17β-estradiolu w surowicy (pmol/l)	124,62±196,72	135,75±155,23
poziomy IL-6 w surowicy (pg/ml)	7,82±5,17	7,11±4,98
poziomy IL-6 w nadsączach z hodowli PBMC	11,11±4,44	10,78±3,97

*grupa HTZ – kobiety, które wyraziły chęć stosowania hormonalnej terapii zastępczej
grupa kontrolna – kobiety, które nie wyraziły zgody na hormonalną terapię zastępczą*

go w surowicy krwi chorych na miażdżycę i/lub chorobę niedokrwienną serca [19]. Cytokiny są to hormono-podobne peptydy i niskocząsteczkowe białka wpływające na funkcje komórek i warunkujące ich wzajemne oddziaływanie. Do najbardziej znanych przedstawicieli cytokin zdolnych do indukcji stanu zapalnego należą: czynnik martwicy guza (TNF), interleukina-1 (IL-1), interleukina-8 (IL-8) oraz interleukina-6 (IL-6).

IL-6 jest pleiotropową cytokiną o masie cząsteczkowej 26 kDa, produkowaną przez różne komórki organizmu ludzkiego. Bierze ona udział w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej, hematopoezie oraz reakcji ostrej fazy [10]. Poza wpływem na odporność humoralną, aktywację limfocytów T [9], dojrzewanie megakariocytów [20] oraz produkcję białek ostrej fazy [13], zdaje się także brać udział w patogenezie różnych chorób, w tym także miażdżycy i jej późnych następstw [5, 7, 15, 17, 18].

Celem naszej pracy było zbadanie wpływu przezskórnej estrogenoterapii na produkcję IL-6 u kobiet w wieku pomenopauzalnym. Być może przeciwmiażdżycowy efekt działania estrogenów związany jest z ich hamującym wpływem na produkcję IL-6 – cytokiny zdającej się odgrywać dużą rolę w patogenezie miażdżycy i jej późnych powikłań.

Materiał

W badaniach wzięło udział 50 zdrowych kobiet w wieku od 45 do 71 lat, z klinicznymi objawami niedoboru estrogenów i poziomami FSH >40 U/l. Pacjentki podzielono na 2 grupy. W grupie I znalazły się kobiety, które wyraziły chęć poddania się hormonalnej terapii za-

stępczej (grupa HTZ), natomiast w grupie II pacjentki, które nie wyraziły zgody na tego typu leczenie (grupa kontrolna). W tab. I przedstawiono ogólną charakterystykę badanych kobiet z obydwu grup. Po wykluczeniu przeciwwskazań do estrogenoterapii, kobiety z grupy HTZ rozpoczęły przyjmować 17β-estradiol w dawce 50 µg/dobę drogą przezskórną (Estraderm 50MX, Novartis PharmaAG, Bazyleja) przez wszystkie dni w mies. oraz 10 mg octanu medroksyprogesteronu (Provera, Pharmacia and Upjohn, Ascoli Piceno) drogą doustną przez 10 dni w mies. Od wszystkich kobiet przed oraz po 6. i 12. mies. obserwacji pobrano 20 ml krwi żyłnej do badań. Zgoda na przeprowadzenie powyższych badań została wydana przez Niezależną Komisję Etyki Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

Metody badawcze

1. Uzyskiwanie surowic

Surowice uzyskiwano z 5 ml krwi żyłnej, którą pobrano do sterylnej probówki. Krew wirowano przez 15 min przy prędkości 2 500 obrotów/min. Następnie surowicę zbierano do sterylnych plastikowych probówek o pojemności 1 ml i przechowywano w temperaturze -70°C do dnia badania.

2. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC)

15 ml krwi żyłnej pobranej do sterylnej probówki na EDTA, rozcieńczano w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) (Gibco BRL, Life Technologies, Berlin) w stosunku 1:1 i nawarstwiano na mieszaninę Ficollu (Amersham Pharmacia Biotech AG, Uppsala) i Uropoliny (Polfa, Starogard) o gęstości 1,077 g/ml. Następnie wirowano przez 15



min przy prędkości 2 500 obrotów/min. Pipetą pastorowską ściągano interfazę, która zawierała PBMC. Po 3-krotnym płukaniu komórek w PBS, zawieszano je w medium RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Berlin) z dodatkiem 5% płodowej surowicy cielęcej (FCS) (Gibco BRL, Life Technologies, Berlin).

3. Hodowle PBMC

Hodowle z PBMC zakładano na 24-dołkowych plastikowych płytkach zawierając 1 x 10⁶ komórek w 1 ml medium RPMI 1640 z dodatkiem 5% FCS. Po 24 godz. inkubacji w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂, w 100% wilgotności, zbierano nadsączy (supernatanty) z nad hodowli i przechowywano w temperaturze -70°C do dalszych oznaczeń.

4. Oznaczanie aktywności IL-6

Aktywność IL-6 w surowicy i supernatantach z nad hodowli PBMC oznaczano używając linii komórkowej B9 wrażliwej na ludzką IL-6 (dar od dr Lucien Aarden, Holenderski Czerwony Krzyż, Amsterdam). Komórki B9 hodowano w medium RPMI 1640 z 2-merkaptotetanołem (2-ME), penicyliną, streptomycyną, glutaminą, pirogionianem i 10 U/ml ludzkiej rekombinowanej IL-6 (Sigma). Do dołków eksperymentalnych na 96-dołkowej, sterylnej plastikowej płytce płaskodennej dodawano 10 x 10³/50 (1 komórek B9, uprzednio wypłukanych czystym RPMI 1640, zawieszonych w medium zawierającym RPMI 1640, 5% FCS, 2 mM L-glutaminę oraz penicylinę i streptomycynę oraz 10 µl rozcieńczonej 1:10 próbki (badanej surowicy lub supernatantu z nad hodowli PBMC). Próby wykonano w trzech powtórzeniach. Następnie płytki inkubowano przez 48 godz. w cieplarni w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂ i 100% wilgotności. Żywotność komórek mierzono testem kolorymetrycznym przy użyciu (3-4.5 dimetyltiazol-2-yl)-2.5 diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Steinheim). Po 48-godzinnej inkubacji do każdego dołka 96-dołkowej płytki dodano po 20 µl roztworu sterylnej MTT – o stężeniu 5 mg/ml i inkubowano przez następne 3 godz. w cieplarni w temp. 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ i 100% wilgotności. Po inkubacji do każdego dołka dodawano 100 µl kwaśnego izopropanolu 0,04 NHCl

i wytrząsano przez 15 min do rozpuszczenia kryształków MTT. Odczyt gęstości optycznej wykonano przy pomocy urządzenia Labsystems Multiscan® MCC/340, przy długości fali 570 nm. Otrzymane wyniki z dołków eksperymentalnych porównywano z wynikami otrzymanymi z dołków zawierających seryjne rozcieńczenia ludzkiej rekombinowanej IL-6. Aby potwierdzić specyficzność testu do wybranych losowo dołków dodawano poliklonalne przeciwciała anty-IL-6 (Genzyme, Russelsheim) w mianie 1:10, 1:20 oraz 1:50 do wybranych dołków. Przeciwciała to całkowicie hamowało zdolność komórek B9 do IL-6 zależnej proliferacji.

5. Oznaczenia poziomów hormonów

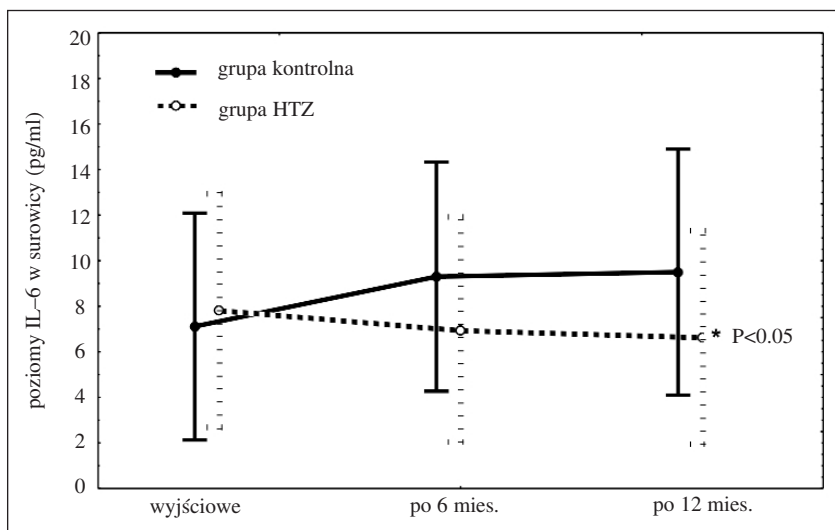
Oznaczeń wyjściowych poziomów FSH i 17β-estradolu w surowicy dokonano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu komercyjnego zestawu firmy Abbott AxSYM (Abbott Park, IL, USA).

6. Statystyczne opracowanie wyników

Otrzymane wyniki analizowano przy użyciu programu komputerowego Statistica'99 dla Windows. Różnice pomiędzy dwoma badanymi grupami oceniano przy użyciu testu Studenta dla prób niezależnych. Wpływ HTZ na poziomy IL-6 oceniano testem Studenta dla prób zależnych.

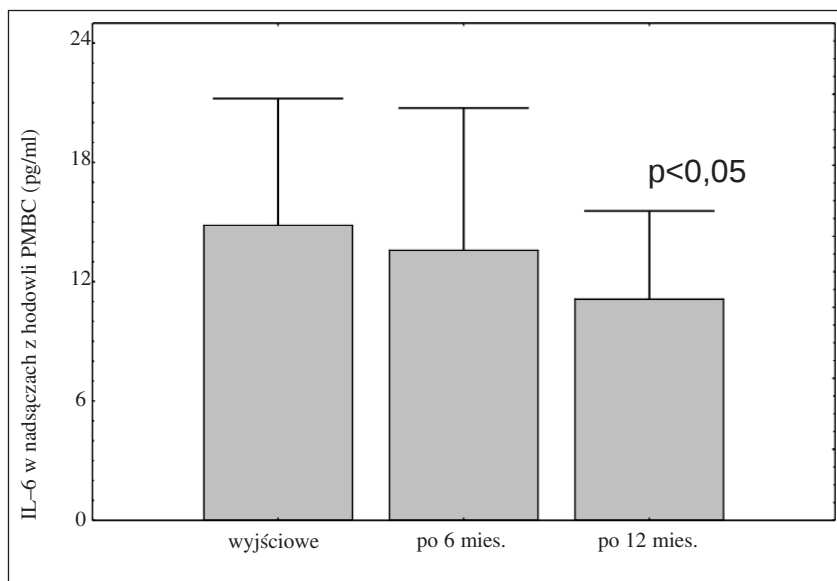
Wyniki

Wyjściowe poziomy IL-6 w surowicy krwi oraz w nadsączy z hodowli PBMC kobiet z obydwu grup nie różniły się w obydwu badanych grupach (tab. I). Po 12. mies. obserwacji w surowicy kobiet z grupy HTZ, poziomy bioaktywnej IL-6 były znacznie niższe po



Ryc. 1. Wpływ przezskórnej estrogenoterapii na poziomy IL-6 w surowicy kobiet w wieku pomenopauzalnym





Ryc. 2. Wpływ przezskórnej estrogenoterapii na produkcję IL-6 przez niestymulowane jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) kobiet w wieku pomenopauzalnym *in vitro*

12. mies. obserwacji w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej ($6,62 \pm 4,68$ pg/ml vs $9,5 \pm 5,4$ pg/ml, $p < 0,05$), u których doszło do niewielkiego ich wzrostu (ryc. 1.).

Ponadto w grupie kobiet przyjmujących HTZ produkcja bioaktywnej IL-6 przez niestymulowane PBMC znacznie się obniżyła po 12. mies. jej trwania ($14,83 \pm 6,37$ pg/ml vs $11,11 \pm 4,44$ pg/ml, $p < 0,05$) (ryc. 2.). W grupie kontrolnej spontaniczna produkcja IL-6 przez PBMC po 12. mies. obserwacji nieznacznie się zwiększyła, jakkolwiek różnica ta nie była istotna statystycznie ($p > 0,05$).

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że przezskórna estrogenoterapia zmniejsza produkcję IL-6 u kobiet w wieku pomenopauzalnym.

Dyskusja

Wyniki licznych badań wykazały, iż estrogeny posiadają właściwości przeciwmiażdżycowe, a hormonalna terapia zastępcza opóźnia rozwój miażdżycy [3, 4]. Dokładne mechanizmy tego zjawiska nie zostały jednak w pełni poznane. IL-6 jako jeden z głównych mediatorów reakcji zapalnej, może brać udział w patogenezie miażdżycy i jej późnych następstwach. Wyniki badań na zwierzęcym modelu miażdżycy dowiodły, iż 17β -estradiol hamuje ekspresję IL-6 w płytkach miażdżycowych [18].

Celem naszej pracy było zbadanie wpływu przezskórnego podawania 17β -estradiolu na produkcję IL-6

u kobiet w wieku pomenopauzalnym. Wyniki naszych badań wykazały, iż po 12. mies. przyjmowania przezskórnej estrogenoterapii, zarówno poziomy IL-6 w surowicy, jak i spontaniczna produkcja IL-6 przez niestymulowane PBMC była znacząco niższa w porównaniu do kobiet, które nie wyraziły zgody na leczenie hormonalne i u których po roku obserwacji poziomy IL-6 w surowicy nieznacznie się podwyższyły. Poprzednie wyniki wieloletnich badań naszego zespołu wykazały, iż produkcja IL-6 rośnie wraz z wiekiem. Ponadto jednojądrzaste komórki krwi osób starych charakteryzują się konstytutywną ekspresją genu kodującego IL-6 [14]. Jaki jest jednak udział wzrastającej produkcji IL-6 w rozwoju mia-

żdżycy? Okazuje się, iż IL-6 może brać zarówno pośredni, jak i bezpośredni udział w patogenezie miażdżycy i jej późnych powikłań. IL-6 posiada właściwości chemotaktyczne w stosunku do niektórych komórek, tworzących nacieki w obrębie płytki miażdżycowej [1]. Ponadto poprzez zwiększanie produkcji płytkowego czynnika wzrostu (PDGF), IL-6 pobudza proliferację komórek mięśniówki gładkiej naczyń, co jest jednym z kluczowych mechanizmów aterogenezy [6]. Obecność podwyższonych poziomów IL-6 wiele lat przed wystąpieniem zawału serca sugeruje udział tej cytokiny w procesie uszkodzenia płytki miażdżycowej [15]. Aktywowane przez IL-6 limfocyty T są obecne w płytce miażdżycowej i prawdopodobnie poprzez produkowanie cytokin prozapalnych przyczyniają się do jej destabilizacji i rozzerwania [11]. IL-6 jako silny induktor produkcji białek ostrej fazy, zwiększa stężenie fibrynogenu w surowicy [12]. Ponadto IL-6 stymuluje trombopoezę i aktywację trombocytów [20]. Te prokoagulacyjne efekty działania IL-6 zwiększają ryzyko zakrzepów oraz także prowadzą do destabilizacji płytki miażdżycowej. Stosowanie więc terapii zmniejszających nadmierną produkcję IL-6 może mieć działanie przeciwmiażdżycowe.

Wnioski

Podsumowując wyniki naszych badań, można stwierdzić, iż przezskórna estrogenoterapia zmniejsza produkcję IL-6 u kobiet w wieku pomenopauzalnym co może być jednym z pośrednich mechanizmów przeciwmiażdżycowego działania estrogenów.



Summary

Objective: To investigate the influence of transdermal oestrogen replacement therapy on interleukin-6 (IL-6) production in postmenopausal women.

Design: Prospective study.

Materials and Methods: Both the serum levels and spontaneous IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in postmenopausal women were measured before and after 6 and 12 months of HRT using the B9 hybridoma bioassay. The subjects were 50 healthy postmenopausal women who were divided into two groups. The HRT group (n=30) started receiving transdermal oestrogen (17 β -oestradiol 50 μ g/day) with a 10 day progestogen regimen (oral medroxyprogesterone acetate 10 mg/day). The control group consisted of 20 women who did not agree to HRT.

Results: At baseline, women from both groups had similar mean IL-6 levels in the sera and PBMC cultures. After 12 months, serum IL-6 levels were significantly lower among women from the HRT group compared to the control group ($p<0.05$). HRT also decreased spontaneous IL-6 production by PBMC after 12 months ($p<0.05$).

Conclusions: Our results indicate that transdermal oestrogen replacement therapy decreases IL-6 production among postmenopausal women. This effect may contribute to the antiatherogenic properties of oestrogens.

Key words: interleukin-6, oestrogen, atherosclerosis, menopause, hormone replacement therapy (HRT), cytokines.

Piśmiennictwo

1. Akira S, Kishimoto T. IL-6 and NF-IL-6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol Rev* 1992; 127: 25-50.
2. Golden SH, Maguire A, Ding J, et al. Endogenous postmenopausal hormones and carotid atherosclerosis: a case-control study of the atherosclerosis risk in communities cohort. *Am J Epidemiol*. 2002; 155: 437-45.
3. Hodis HN, Mack WJ, Lobo R. Postmenopausal hormone replacement therapy as antiatherosclerotic therapy. *Curr Atheroscler Rep* 2002; 4: 52-8.
4. Holm P. Effect of estrogen on development of atherosclerosis. A review of experimental animal studies. *Dan Med Bull* 2001; 48: 146-60.
5. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, et al. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2364-7.
6. Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, et al. Interleukin-6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am J Physiol* 1991; 260: H1713-17.
7. Ikeda U, Ikeda M, Seino Y, et al. Interleukin - 6 gene transcripts are expressed in atherosclerotic lesions of genetically hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 1992; 92: 213-8.
8. Jonasson L, Holm J, Skalli O, et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-8.
9. Kuhweide R, Van Damme J, Lorre K, et al. Accessory cell-derived helper signals in human T-cell activation with phytohemagglutinin: induction of interleukin-2, responsiveness by interleukin-6 and production of interleukin-2 by interleukin-1. *Cytokine* 1990; 2: 45-54.
10. Le J, Vilcek L. Interleukin-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest* 1998; 61: 588-602.
11. Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25 (suppl 2): S9-S12.
12. Margaglione M, Grandone E, Mancini FP, Di Minno G. Genetic modulation of plasma fibrinogen concentrations: possible importance of interleukin-6. *J Thromb Thrombolysis* 1996; 3: 51-6.
13. Mayer P, Geissler K, Valent P, et al. Recombinant human interleukin 6 is a potent inducer of the acute phase response and elevates the blood platelets in nonhuman primates. *Exp Hematol* 1991; 19: 688-96.
14. Myśliwska J, Bryl E, Foerster J, et al. Increase of interleukin-6 and decrease of interleukin-2 production during the ageing process are influenced by the health status. *Mech Ageing Dev* 1998; 100: 313-28.
15. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101: 1767-72.
16. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
17. Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, et al. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine* 1994; 6: 87-91.
18. Sukovich DA, Kauser K, Shirley FD, et al. Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17 β -estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1498-505.
19. Tracy R. Atherosclerosis, thrombosis and inflammation: a question of linkage. *Fibrinol Proteolysis* 1997; 11 (Suppl 1): 137-42.
20. Williams N, Bertoncello I, Jackson H, et al. The role of interleukin-6 in megakaryocyte formation, megakaryocyte development and platelet production. *Ciba Found Symp* 1992; 167: 160-70.

Adres do korespondencji

Zakład Immunologii, Katedra Histologii i Immunologii AM w Gdańsku
ul. Dębinki 1
80-210 Gdańsk

