

## Wpływ stosowania hormonoterapii zastępczej na stężenie fosfatazy zasadowej i fosfatazy kwasowej w surowicy i ślinie u kobiet z niedoborem estrogenów

### *Influence of hormone replacement therapy on the level of alkaline phosphatase and acid phosphatase in serum and saliva among women with estrogen deficiency*

Mansur Rahnama, Tomasz Jachewicz, Michał Łobacz, Wioletta Czajkowska, Marcin Stelmaszyk

Zakład Chirurgii Stomatologicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie;  
kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Mansur Rahnama

Przeгляд Menopauzalny 2012; 6: 506–509

#### Streszczenie

Coraz częściej w celu złagodzenia niekorzystnych objawów będących następstwem ustania czynności endokrynnej jajników kobiety w okresie menopauzalnym stosują hormonalną terapię zastępczą (HTZ). Praca ma na celu ocenę wpływu HTZ na tkankę kostną poprzez określenie całkowitego stężenia fosfatazy zasadowej i fosfatazy kwasowej.

Badaniem objęto 120 kobiet w okresie menopauzalnym, z których 60 przyjmowało leki hormonalne. Grupę kontrolną stanowiło 60 kobiet niestosujących HTZ. Materiałem poddawanym badaniom była ślina niestymulowana oraz krew żylna pobierane na czczo. Materiał wirowano, aby otrzymać supernatant (ślina) i surowicę (krew) oraz przechowywano do chwili badań w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Uzyskano statystycznie istotne różnice w stężeniach obu enzymów w krwi pacjentek z obu grup. W ślinie różnice nie były istotne statystycznie.

**Słowa kluczowe:** menopauza, terapia hormonalna zastępcza, fosfataza zasadowa, fosfataza kwasowa.

#### Summary

To alleviate the adverse effects resulting from the cessation of ovarian endocrine function, menopausal women use more and more often hormone replacement therapy (HRT). This article aims to assess the impact of HRT on bone tissue, by determining the total level of alkaline phosphatase and acid phosphatase.

The study included 120 women in the menopausal period, of which 60 received hormonal treatment. The control group comprised 60 women not using HRT. The tested material was the unstimulated saliva and venous blood collected in a fasting state. The material was centrifuged to obtain supernatant (saliva) and serum (blood) and stored until the testing at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Statistically significant differences in the level of both enzymes in the blood of both groups of patients were obtained. In saliva, the differences were not statistically significant.

**Key words:** menopause, hormone replacement therapy, alkaline phosphatase, acid phosphatase.

#### Wstęp

Metabolizm kostny i jego dynamika są uzależnione od etapu rozwoju organizmu. Zarówno kość gąbczasta, jak i kość zbita podlegają stałej przebudowie przez całe życie osobnicze. Proces ten nazywa się przebudową wewnętrzną tkanki kostnej (*remodeling*). Duży wpływ na przebudowę ma układ hormonalny. W okresie menopauzy czy po owariektomii dochodzi do zmniejszenia

produkcji i wydzielania steroidowych hormonów płciowych. Średnie stężenie estradiolu u kobiet po menopauzie wynosi 15 pg/ml, natomiast po operacji usunięcia jajników 10 pg/ml lub mniej [1, 2].

Badania ostatnich lat wykazują, że niedobór estrogenów w ustroju występujący w okresie pomenopauzalnym lub po owariektomii powoduje zaburzenia równowagi metabolizmu kostnego, z przewagą procesów resorpcyjnych. Proces zmniejszenia masy kostnej nie

Adres do korespondencji:

Tomasz Jachewicz, Zakład Chirurgii Stomatologicznej UM Lublin, Stomatologiczne Centrum Kliniczne UM Lublin, ul. Karmelicka 7, 20-081 Lublin, tel. 696 079 813, e-mail: tjachewicz@gmail.com

przebiega jednak liniowo, lecz dynamicznie (fazowo). Wysoki obrót kostny (faza aktywna) występuje na przemian z niskim obrotem kostnym (faza nieaktywna) [3].

W procesie przebudowy kości główną rolę ogrywiają dwa rodzaje komórek – osteoblasty (komórki kościotwórcze) oraz osteoklasty (komórki kościogubne).

Obecnie przyjmuje się dwie teorie oddziaływania estrogenów na tkankę kostną – receptorową i pośrednią. Receptorowy mechanizm metabolizmu kostnego nie został jeszcze dokładnie poznany. Stwierdzono jednak, że zarówno klasyczne receptory estrogenowe  $\alpha$  (*estrogen receptor* – ER $\alpha$ ), jak i ostatnio zidentyfikowane  $\beta$  (ER $\beta$ ) odgrywają ważną rolę w różnicowaniu osteoblastów oraz uczestniczą w procesie mineralizacji nowo tworzących się komórek kostnych [4]. Pod wpływem estrogenów w komórkach kościotwórczych powstaje transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ 1 – TGF- $\beta$ 1), który wywiera krótkotrwałe działanie hamujące resorpcję kości i nasila naturalny proces obumierania komórek kościogubnych (tzw. apoptoza osteoklastów), co w efekcie prowadzi do zmniejszenia resorpcji tkanki kostnej. Teoria pośrednia przyjmuje główną rolę kalcytoniny pośredniczącej w oddziaływaniu estrogenów na tkankę kostną. Podstawowe działanie kalcytoniny polega na hamowaniu resorpcji kości poprzez bezpośrednie hamowanie aktywności osteoklastów. Kalcytonina hamuje również resorpcję stymulowaną takimi czynnikami, jak parathormon, 1,25(OH) $_2$ D $_3$  i prostaglandynę E $_2$  (PGE $_2$ ) oraz zwiększa liczbę i aktywność osteoblastów. Zmniejszenie stężenia estrogenów może prowadzić do osłabienia procesu tworzenia tkanki kostnej przez osteoblasty i wtórnie poprzez wyłączenie wydzielania kalcytoniny może powodować aktywowanie osteoklastów przez parathormon i 1,25(OH) $_2$ D $_3$  do resorpcji kości [5–7].

Estrogeny mogą również wpływać na osteoblasty i osteoklasty pośrednio, poprzez wpływ na lokalne wydzielanie interleukin 1 i 6, czynnika martwicy nowotworów TNF- $\alpha$  i czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* – GM-CSF), które mogą nasilać resorpcję kości pod wpływem osteoklastów [8].

Ocena metabolizmu kostnego opiera się na licznych metodach diagnostycznych, wśród których istotną rolę odgrywają markery obrotu kostnego. Ich stężenie we krwi lub w ślinie jest wypadkową aktywności procesów przebudowy odbywających się w danym momencie w obrębie całego układu kostnego. W celu określenia metabolizmu można posłużyć się metodą oznaczenia poziomu czynników uważanych za markery metabolizmu tkanki kostnej.

Fosfataza kwasna i fosfataza zasadowa są uważane za wysoce swoiste markery metabolizmu kości. Są to enzymy wydzielane przez osteoklasty, w przypadku fosfatazy kwasnej, i osteoblasty – dla fosfatazy zasadowej. Odzwierciedlają proces apozycji (fosfataza zasadowa) i resorpcji (fosfataza kwasna) tkanki kostnej.

Hormonalna terapia zastępcza (HTZ) jest od dawna uznanym sposobem postępowania w przypadku niekorzystnych objawów będących następstwem ustania czynności endokrynnej jajników. Większość autorów zgadza się, że korzystny wpływ HTZ na układ kostny ma istotne znaczenie w zmniejszeniu ryzyka wystąpienia osteoporozy pomenopauzalnej, a estrogeny powinny być jednym z podstawowych elementów w leczeniu osteoporozy u kobiet po menopauzie.

Celem pracy było oznaczenie całkowitego poziomu aktywności fosfatazy zasadowej i kwasnej w surowicy i w ślinie u kobiet w okresie menopauzy.

## Materiał i metody

Grupa badana (M + HTZ) składała się z 60 kobiet w okresie menopauzalnym (średnia wieku 53 lata) stosujących HTZ. Grupę kontrolną (M) stanowiło 60 kobiet w okresie klimakterium (średnia wieku 55,4 roku) niepoddanych hormonalnej terapii zastępczej.

W celu wykonania badań laboratoryjnych pobierano od kobiet na czczo ślinę niestymulowaną w godzinach porannych oraz krew żylną z żyły łokciowej. Po odwirowaniu materiału badanego otrzymany supernatant (ślina) i surowicę (krew) przechowywano do chwili badań biochemicznych w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . W badanym materiale oznaczono stężenie fosfatazy zasadowej i kwasnej – metodą kolorymetryczną w aparacie Express Plus, przy użyciu zestawów odczynnikowych Chiron/Diagnostic oraz odczynników Bayer HealthCare (USA).

## Wyniki

Średnie stężenie fosfatazy zasadowej (oznaczone jako suma wszystkich izoform) w surowicy u kobiet w grupie M + HTZ wynosiło 76 U/l. W grupie M, w której kobiety będące w okresie menopauzy nie stosowały HTZ, stężenie tego enzymu wynosiło 59,56 U/l (tab. I). Różnica w wartościach między grupami M + HTZ i M była statystycznie istotna.

Poziom fosfatazy zasadowej (jako suma wszystkich izoform) w ślinie u kobiet w grupie M + HTZ wyniósł średnio 10,25 U/l. W grupie M, w której kobiety nie stosowały HTZ, stężenie tego enzymu było mniejsze i wynosiło 9,40 U/l (tab. II). Różnice w stężeniach fosfa-

Tab. I. Stężenie fosfatazy zasadowej w surowicy w badanych grupach kobiet

Grupa	n	Stężenie ALP w surowicy [U/l] (M $\pm$ SD)	Istotność różnic (p)*
M	60	59,56 $\pm$ 11,60	a
M + HTZ	60	76,00 $\pm$ 8,12	b

\*Średnie różnią się istotnie, jeśli nie są oznaczone tą samą literą alfabetu; n – liczba próbek, ALP – fosfataza zasadowa (alkaline phosphatase) Grupa M + HTZ różni się istotnie od grupy M

**Tab. II.** Stężenie fosfatazy zasadowej w ślinie w badanych grupach kobiet

Grupa	n	Stężenie ALP w ślinie [U/l] (M ± SD)	Istotność różnic (p)*
M	60	9,40 ±3,97	a
M + HTZ	60	10,25 ±3,73	a

\*Średnie różnią się istotnie, jeśli nie są oznaczone tą samą literą alfabetu;  
n – liczba próbek, ALP – fosfataza zasadowa (alkaline phosphatase)  
Grupy nie różnią się istotnie

tazy zasadowej w ślinie między poszczególnymi grupami były nieistotne statystycznie.

W celu zbadania zależności pomiędzy poziomem fosfatazy zasadowej w surowicy i ślinie obliczono współczynniki korelacji *r* Pearsona. Tylko w grupie M + HTZ korelacja była statystycznie istotna i była bardzo wysoka ( $r = 0,7645$ ) (tab. III). Oznacza to, że dla populacji M + HTZ można uważać, że wzrost poziomu fosfatazy zasadowej w surowicy o 1 jednostkę powodował wzrost poziomu tego enzymu w ślinie o 0,3514 jednostki.

**Tab. III.** Korelacja *r* Pearsona pomiędzy stężeniem fosfatazy zasadowej (ALP) w surowicy i w ślinie

Grupa	n	Współczynnik korelacji <i>r</i> Pearsona
M	60	0,0438
M + HTZ	60	0,7645

**Tab. IV.** Stężenie fosfatazy kwaśnej w surowicy w badanych grupach kobiet

Grupa	n	Stężenie ACP T w surowicy [U/l] (M ± SD)	Istotność różnic (p)*
M	60	2,66 ±1,08	a
M + HTZ	60	6,60 ±5,66	b

\*Średnie różnią się istotnie, jeśli nie są oznaczone tą samą literą alfabetu;  
n – liczba próbek, ACP T – fosfataza kwaśna (testicular acid phosphatase)  
Grupa M + HTZ różni się istotnie od grupy M

**Tab. V.** Stężenie fosfatazy kwaśnej w ślinie w badanych grupach kobiet

Grupa	n	Stężenie ACP T w ślinie [U/l] (M ± SD)	Istotność różnic (p)*
M	60	47,87 ±23,16	a
M + HTZ	60	50,68 ±20,97	a

\*Średnie różnią się istotnie, jeśli nie są oznaczone tą samą literą alfabetu;  
n – liczba próbek, ACP T – fosfataza kwaśna (testicular acid phosphatase)  
Grupy nie różnią się istotnie

**Tab. VI.** Korelacja *r* Pearsona między stężeniem fosfatazy kwaśnej (ACP T) w surowicy i w ślinie

Grupa	n	Współczynnik korelacji <i>r</i> Pearsona
M	60	0,4433
M + HTZ	60	0,2150

Średnie stężenie fosfatazy kwaśnej (oznaczone jako suma wszystkich izoform) w surowicy w badanej grupie kobiet M + HTZ wynosiło 6,60 U/l, w grupie kobiet będących w okresie menopauzy i niestosujących HTZ – grupa M – stężenie tego enzymu było mniejsze i wynosiło 2,66 U/l, różnica była statystycznie istotna (tab. IV).

Poziom fosfatazy kwaśnej (oznaczone jako suma wszystkich izoform) w ślinie badanych kobiet wynosił średnio 50,68 U/l w grupie M + HTZ i 47,87 U/l w grupie M (tab. V). Różnica w poziomie tego enzymu między poszczególnymi grupami była statystycznie nieistotna.

W celu zbadania zależności pomiędzy stężeniem fosfatazy kwaśnej w surowicy i w ślinie obliczono współczynniki korelacji *r* Pearsona (tab. VI). W obu grupach korelacje między stężeniem fosfatazy kwaśnej w surowicy i poziomem tego enzymu w ślinie nie były istotne statystycznie.

## Dyskusja

Fosfataza kwaśna należy do markerów resorpcji kości. Wyniki badań pomiaru aktywności tego enzymu w surowicy i ślinie dotyczą całości frakcji, są sumą aktywności 5 izoenzymów. Jednak głównym wskaźnikiem nasilenia procesów resorpcji tkanki kostnej jest frakcja oporna na winian [9].

Z tego powodu uzyskane wyniki badań własnych pomiaru całkowitej aktywności tego enzymu w surowicy i ślinie poszczególnych grup kobiet mogą nie w pełni odzwierciedlać intensywność procesu resorpcji tkanki kostnej. Wskazane są dalsze badania w celu oceny poziomu frakcji odpornej na winian, na podstawie których będzie można dokładniej określić, czy stosowanie HTZ znacząco zmniejsza resorpcję kości.

Aktywność fosfatazy zasadowej w surowicy jest najczęściej oznaczanym wskaźnikiem tworzenia tkanki kostnej. Stężenie tego markera w surowicy zależy od obecności jego izoenzymów: wątrobowego, kostnego i jelitowego oraz łożyskowego u kobiet ciężarnych. Frakcja kostna fosfatazy zasadowej odpowiada za ok. 60% jej całkowitej aktywności w surowicy [10, 11].

Stwierdzono, że aktywność całkowita fosfatazy zasadowej słabo koreluje z szybkością tworzenia tkanki kostnej, natomiast frakcja kostna tego enzymu dobrze odzwierciedla aktywność przebudowy tkanki kostnej [9].

Wyniki badań własnych pomiaru aktywności fosfatazy zasadowej w surowicy i ślinie dotyczą całości frakcji tego enzymu, dlatego nie informują one jednoznacznie o tempie procesów zachodzących w tkance kostnej u kobiet w poszczególnych grupach. Wskazane są dalsze badania poziomu frakcji kostnej fosfatazy zasadowej, dzięki którym będzie możliwa dokładniejsza ocena wpływu stosowania HTZ na tworzenie tkanki kostnej.

## Wnioski

Stężenie fosfatazy kwaśnej i zasadowej w surowicy kobiet przyjmujących HTZ było większe niż u kobiet w okresie menopauzalnym, które nie przyjmowały HTZ.

Hormonalna terapia zastępcza stosowana u kobiet po menopauzie nie ma wpływu na stężenie fosfatazy kwaśnej i zasadowej w ślinie.

Wskazane są dalsze badania podające ocenie poziom frakcji odpornej na winian fosfatazy kwasowej w celu określenia wpływu stosowania HTZ na zmniejszenie resorpcji tkanki kostnej. Badania całkowitego poziomu tego enzymu są nieprecyzyjne.

Wskazane są dalsze badania podające ocenie poziom frakcji kostnej fosfatazy kwasowej w celu określenia wpływu stosowania HTZ na nasilenie tworzenia tkanki kostnej. Badania całkowitego poziomu tego enzymu są nieprecyzyjne.

## Piśmiennictwo

1. Freeman EW, Sammel MD, Liu L, Martin P. Psychometric properties of a menopausal symptom list. *Menopause* 2003; 10: 258-65.
2. Janiec W. Kompendium farmakologii. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2006.
3. Warenik-Szymankiewicz A, Męczekalski B. Wpływ estrogenów na metabolizm tkanki kostnej w warunkach fizjologii i patologii. *Stand Med* 2007; 4: 143-5.
4. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S. Estrogen receptors alfa and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 1997; 32: 19858-62.
5. de Cherney A. Physiologic and pharmacologic effects of estrogen and progestins on bone. *J Reprod Med* 1993; 38: 1007-14.
6. Łukaszewicz J, Lorenc RS. Udział czynników endokrynych i parakrynych w etiopatogenezie osteoporozy. *Terapia* 2008; 17: 6-13.
7. Väänänen H, Härkönen P. Estrogen and bone metabolism. *Maturitas* 1996; 23 (Suppl.): 65-9.
8. Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 1993; 260: 626-30.
9. Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, et al. Comparison of bone and total alkaline phosphatase activity on bone turnover during menopause and in patients with established osteoporosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 47: 177-83.
10. Galus K. Choroby metaboliczne kości. Med Tour Press International, Warszawa 1994.
11. Marcinowska-Suchowierska E, Lisawa A, Marowska J. Biochemiczne markery przebudowy kości i ich przydatność do diagnostyki osteoporozy. *Wiad Lek* 1992; 45: 647-54.