

# Hormonalna terapia zastępcza u kobiet po menopauzie a wybrane funkcje neutrofilii – preaktywacja TNF- $\alpha$

## *Hormonal replacement therapy in postmenopausal women and neutrophils selected functions – TNF- $\alpha$ preactivation*

Tomasz Stetkiewicz<sup>1</sup>, Ireneusz Połać<sup>1</sup>, Grzegorz Stachowiak<sup>1</sup>, Sławomir Jędrzejczyk<sup>1</sup>, Hanna Romanowicz-Makowska<sup>2</sup>, Grzegorz Surkont<sup>2</sup>, Tomasz Pertyński<sup>1</sup>

*Neutrofile wykazują zdolność do chemotaksji, adherencji, fagocytozy i destrukcji sfagocytowanych mikroorganizmów przy pomocy mechanizmów tlenowych i pozatlenowych oraz do degranulacji i uwalniania ziarnistości wewnątrzkomórkowych i produktów metabolizmu tlenowego komórki. Mogą także produkować cytokiny zapalne. Są jednym z najważniejszych źródeł reaktywnych form tlenu w organizmie. W pracy badano wpływ złożonej ciągłej hormonalnej terapii zastępczej u kobiet po menopauzie na preaktywację (priming) TNF- $\alpha$  neutrofilii krwi obwodowej. Stwierdzono zmniejszenie zjawiska primingu już po 3 mies. stosowania tej terapii.*

**Słowa kluczowe:** neutrofile, TNF- $\alpha$ , priming, HTZ

(Przegląd Menopauzalny 2004; 5: 63–66)

### Wstęp

Neutrofile w organizmie ludzkim pełnią niezwykle istotną rolę we wczesnej odpowiedzi, skierowanej przeciwko organizmom patogennym ze środowiska zewnętrznego, zjawiając się jako pierwsze komórki w miejscu toczącego się procesu zapalnego [1]. Cechuje je krótki czas życia, duża aktywność biologiczna i duża zdolność do migracji. Codziennie ok. 100 mln neutrofilii opuszcza krążenie, ulegając apoptozie, a na ich miejsce trafiają nowe komórki [1].

Neutrofile wykazują zdolność do chemotaksji, adherencji, fagocytozy i destrukcji sfagocytowanych mikroorganizmów przy pomocy mechanizmów tlenowych i pozatlenowych oraz do degranulacji i uwalniania ziarnistości wewnątrzkomórkowych i produktów metabolizmu tlenowego komórki. Mogą także produkować cytokiny zapalne [1]. Są jednym z najważniejszych źródeł reaktywnych form tlenu w organizmie [1].

Funkcje neutrofilii, takie jak migracja, fagocytoza, degranulacja, wytwarzanie reaktywnych form tlenu podlegają regulacji pod wpływem różnych mediatorów [1].

<sup>1</sup>Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

<sup>2</sup>Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, w Łodzi, kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

<sup>3</sup>I Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Szpital im. M. Madurowicza; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Jacek Suzin



Jednym z takich mediatorów jest TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy guzów (ang. *tumor necrosis factor*) jest białkiem o masie 17 000 daltonów, w skład którego wchodzi 157 aminokwasów. Nazwa tej cytokiny wywodzi się z badań, prowadzonych przez Carswella [2], który wykrył jej obecność w osoczu zwierząt po podaniu endotoksyny. Uważano początkowo, że jest to czynnik wywołujący martwicę nowotworów, wytwarzany przez komórki jednojądrzaste pod wpływem mediatorów zapalenia lub mitogenów [3]. Z dalszych osiągnięć badawczych dotyczących TNF- $\alpha$  należy wspomnieć o ustaleniu sekwencji aminokwasów wchodzących w jego skład oraz zmapowaniu jego genu w 6. parze chromosomów [4].

TNF- $\alpha$  pełni w organizmie ludzkim rolę mediatora wielu procesów zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. Cytokina ta spełnia bardzo ważną rolę w reakcjach procesu zapalnego. Jest jednym z najsilniejszych modyfikatorów funkcji neutrofilów [1, 5]. Ma zdolność indukcji aktywności cytotatycznej i cytotoksycznej neutrofilów w stosunku do komórek nowotworowych [6].

Stwierdzono, że pod bezpośrednim wpływem TNF- $\alpha$  dochodzi do zwiększonej ekspresji receptorów integrynowych neutrofila, nasilenia fagocytozy oraz do niewielkiego wzmocnienia wybuchu oddechowego [7].

Termin *priming* został wprowadzony w 1984 r. przez Guthrie i wsp. [8] do określenia zjawiska wzrostu generacji wolnych rodników przez stymulowane neutrofile po uprzedniej ich preinkubacji z lipolisacharydami. Ten sam termin został zastosowany w odniesieniu do wzmoczonej odpowiedzi neutrofilów na stymulatory, obserwowanej po preaktywacji czynnikiem pochodzącym z aktywowanych komórek jednojądrzastych [9]. Czynnik ten został wyizolowany i zidentyfikowany jako TNF- $\alpha$  [3]. Późniejsze badania potwierdziły zdolność TNF- $\alpha$  do preaktywacji neutrofilów, tzw. *primingu*. W wyniku preaktywacji neutrofilów przy użyciu tej cytokiny, w odróżnieniu od działania bezpośredniego, dochodziło do wzmoczonej ich odpowiedzi na następny bodziec.

Opisano zwiększenie wybuchu tlenowego po inkubacji neutrofilów z TNF- $\alpha$  i fMLP [7]. Inne badania potwierdzały, że TNF- $\alpha$  sam nie aktywował wytwarzania reaktywnych form tlenu i nie nasilał agregacji i degranulacji, ale preinkubacja neutrofilów z TNF- $\alpha$  nasilała znacznie odpowiedź komórek na stymulatory (np. fMLP). Stwierdzono, że efekt preaktywacji zależał od stężenia TNF- $\alpha$ , czasu preinkubacji i temperatury otoczenia [10]. Wiles [11] opisał znaczne zwiększenie poziomu wybuchu tlenowego indukowanego fMLP, C5a, opsonizowanym zymosanem po preinkubacji neutrofilów z TNF- $\alpha$ . Neutrofile preinkubowane z TNF- $\alpha$ , w porównaniu do GM-CSF, G-CSF i IL-8 wykazywały największy poziom wybuchu oddechowego po stymulacji fMLP. Jednocześnie preaktywacja przez TNF- $\alpha$  najbardziej zwiększała intensywność wiązania fMLP ze swoistym receptorem na neutrofilu [12].

TNF- $\alpha$  łączy się na powierzchni komórki z receptorami TNF-R (p55, CD120a i p75, CD120b). Bada-

nia Zemana i wsp. [1] dostarczają wielu informacji o roli wyżej wymienionych receptorów. Mechanizm transdukcji sygnału na tej drodze receptorowej jest słabo poznany. Przypuszczalnie dochodzi do wzrostu aktywności oksydazy NAD (P) H oraz poprzez jądrowe czynniki transkrypcyjne NF-KB do zmiany transkrypcji genów szeregu biologicznie ważnych mediatorów wtórnych, m.in. IL-1, 6, 8 oraz czynników: PAF, NGF, TGF- $\beta$ , LTB<sub>4</sub>, GM-CSF, G-CSF. Dochodzi także do wzrostu ekspresji receptorów powierzchniowych, takich jak integryny CD11/CD14 [13, 14].

## Cel pracy

Ocena wpływu złożonej ciągłej hormonalnej terapii zastępczej u kobiet po menopauzie na preaktywację (*priming*) TNF- $\alpha$  neutrofilów krwi obwodowej.

## Metodyka

Badaną grupę stanowiło 46 kobiet w okresie pomenopauzalnym, będących pacjentkami Poradni Kliniki Ginekologii i Chorób Menopauzy ICZMP w Łodzi. Średni wiek w badanej grupie wynosił 54,0 $\pm$ 5,1 lat, średni wiek wystąpienia menopauzy 49,1 $\pm$ 3,5 lat, a średni czas od wystąpienia menopauzy 5,0 $\pm$ 4,1 lat.

Kryteriami wykluczającymi były istnienie przeciwwskazań do hormonalnej terapii zastępczej, ostre lub przewlekłe choroby zapalne, cukrzyca, stosowanie leków o właściwościach antyoksydacyjnych i HTZ w okresie ostatnich 6 mies.

Na wykonywanie badań uzyskano zgodę Komisji Etyki Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Łodzi.

Pacjentki zakwalifikowano do hormonalnej terapii zastępczej. Zastosowano HTZ doustną zawierającą 17beta-estradiol i octan norethisteronu.

Efekt antyoksydacyjny HTZ określano, porównując generację reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej pacjentek, ocenianą na podstawie pomiaru chemiluminescencji (CL) w czasie tzw. wybuchu tlenowego tych komórek przed rozpoczęciem hormonalnej terapii zastępczej oraz po 3 i po 6 mies. stosowania tej terapii. Do wywołania wybuchu tlenowego neutrofilów zastosowano następujące stymulatory: formylo-metionilo-leucylofenyloalaninę (fMLP), octan mirystynianu forbolu (PMA) i zymosan firmy Sigma-Aldrich. Jako wzmacniacza chemiluminescencji bezpośrednio użyto luminolu (Sigma-Aldrich). Do preaktywacji (*primingu*) neutrofilów używano rekombinowanego ludzkiego TNF- $\alpha$  (5x10<sup>7</sup> U/mg) (Sigma-Aldrich). Płyn PBS (fizjologiczny roztwór NaCl zbuforowany fosforanami) pochodził z firmy Biomed.

Pomiaru chemiluminescencji dokonywano przy użyciu aparatu LUMINOMETR 1251 (Pharmacia LKB).



**Tab. I. Preaktywacja (priming) neutrofilii TNF- $\alpha$  podczas stosowania HTZ**

|   |             | Parametry statystyczne               | Okres stosowania HTZ         |                              |                              | Rezultaty analizy wariancji* <sup>p</sup> |
|---|-------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---|
| stosunek pól<br>=po preaktywacji/<br>bez preaktywacji   | BS (n= 6)   | średnia $\pm$ SD<br>minimum÷maksimum | 1,31 $\pm$ 0,45<br>0,85÷1,96 | 1,14 $\pm$ 0,32<br>0,67÷1,74 | 1,1 $\pm$ 0,2<br>0,8÷1,53    | <0,0005                                   |
|   | FMLP (n=46) | średnia $\pm$ SD<br>minimum÷maksimum | 1,94 $\pm$ 0,47<br>1,29÷3,47 | 1,35 $\pm$ 0,29<br>0,72÷2,13 | 1,38 $\pm$ 0,27<br>1,02÷2,41 | <0,0005                                   |
|   | PMA (n=46)  | średnia $\pm$ SD<br>minimum÷maksimum | 1,94 $\pm$ 0,52<br>1,31÷4,24 | 1,34 $\pm$ 0,20<br>0,93÷1,89 | 1,36 $\pm$ 0,35<br>0,97÷3,07 | <0,0005                                   |
|   | Z (n=46)    | średnia $\pm$ SD<br>minimum÷maksimum | 1,79 $\pm$ 0,40<br>1,21÷3,02 | 1,29 $\pm$ 0,28<br>0,22÷2,03 | 1,30 $\pm$ 0,28<br>1,03÷2,69 | <0,0005                                   |
| stosunek pików<br>=po preaktywacji/<br>bez preaktywacji | BS (n 46)   | średnia $\pm$ SD<br>minimum÷maksimum | 1,29 $\pm$ 0,51<br>0,76÷1,95 | 0,73 $\pm$ 0,40<br>0,16÷1,8  | 1,14 $\pm$ 0,38<br>0,76÷1,64 | <0,0005                                   |
|   | fMLP (n=46) | średnia $\pm$ SD<br>minimum÷maksimum | 1,96 $\pm$ 0,54<br>1,11÷3,59 | 1,36 $\pm$ 0,42<br>0,75÷2,88 | 1,53 $\pm$ 0,91<br>0,67÷7,12 | <0,0005                                   |
|   | PMA (n=46)  | średnia $\pm$ SD<br>minimum÷maksimum | 1,87 $\pm$ 0,78<br>0,84÷5,10 | 1,29 $\pm$ 0,31<br>0,64÷2,30 | 1,43 $\pm$ 0,48<br>0,73÷2,97 | <0,0005                                   |
|   | Z (n=46)    | średnia $\pm$ SD<br>minimum÷maksimum | 1,70 $\pm$ 0,43<br>1,05÷2,80 | 1,18 $\pm$ 0,32<br>0,21÷1,91 | 1,30 $\pm$ 0,36<br>0,62÷2,04 | <0,0005                                   |

BS – bez stymulacji  
PMA – stymulacja octanem mirystynianu forbolu  
\*jednoczynnikowa analiza wariancji dla zmiennych zależnych

fMLP – stymulacja formilo-metionilo-leucylofenyloalaniną  
Z – stymulacja zymosanem

Badania przeprowadzono w stałej temperaturze 37°C $\pm$ 0,1. Luminometr w ciągu 30 min dokonywał 15 pomiarów. Każdą serię pomiarów wykonywano na 4 próbkach krwi, powtarzając ją 2-krotnie. Na podstawie wyników pomiarów obliczano parametry chemiluminescencji: a) pole powierzchni pod krzywą emisji w funkcji czasu, liczoną w ciągu 30 min, wyrażające całkowitą ilość energii wyemitowaną przez komórki w czasie pomiaru), b) maksimum krzywej emisji. Oceniano chemiluminescencję spontaniczną (BS) i stymulowaną fMLP, PMA i zymosanem neutrofilii. Próbkę, w których oceniano wybuch tlenowy neutrofilii spoczynkowych zawierały: 20  $\mu$ l krwi pełnej, 20  $\mu$ l luminolu, 20  $\mu$ l PBS (BS), lub 20  $\mu$ l fMLP (2x10<sup>-6</sup> M/ml), lub 20  $\mu$ l PMA (2x10<sup>-8</sup> M/ml) lub 30 (1 zymosanu (10 mg/ml), PBS do łącznej objętości 1 000  $\mu$ l. Próbkę, w których oceniano wybuch tlenowy neutrofilii preaktywowanych były inkubowane przez 30 min z TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) przed dodaniem stymulatorów.

Do oceny istotności zmian wartości parametrów chemiluminescencji w czasie stosowania HTZ zastosowano metody analizy wariancji dla zmiennych zależnych.

## Wyniki

Stosunek pól pod krzywymi CL i stosunek pików CL neutrofilii preaktywowanych, będące miarą preaktywacji (*primingu*) również uległy zmniejszeniu po 3 mies. stosowania HTZ w sposób statystycznie istotny dla wszystkich stymulatorów (p<0,0005).

*Priming* neutrofilii niestymulowanych i stymulowanych fMLP, PMA i zymosanem, oceniany na podstawie stosunku całkowitych energii CL neutrofilii preaktywowanych i spoczynkowych, zmniejszył się średnio po 3. stosowania HTZ odpowiednio o 13, 30,4, 30,9 i 27,9%, a po 6 mies. średnio o 16, 28,9, 29,9 i 27,4% (p<0,0005).

## Dyskusja

Analizując parametry chemiluminescencji zarówno neutrofilii spoczynkowych, jak i preaktywowanych możliwa stała się ocena wpływu HTZ na *priming* neutrofilii TNF- $\alpha$ . Wykazano, że już 3-miesięczne stosowanie hormonoterapii zastępczej powoduje zmniejszenie zjawiska *primingu* neutrofilii. Stwierdzona zależność nie znajduje odniesień w piśmiennictwie.

W dostępnej literaturze można znaleźć jedynie prace poświęcone badaniu poziomów TNF- $\alpha$  u kobiet po menopauzie, jak i wpływowi hormonalnej terapii zastępczej na te poziomy.

Brooks-Asplund i wsp. stwierdzili 2-krotny wzrost stężenia TNF- $\alpha$  po zastosowaniu zarówno terapii estrogenowej, jak i estrogenowo-gestagenowej [15].

Podobnie w badaniach Porter i wsp. w grupie 27 kobiet pomenopauzalnych, stosujących HRT estrogenowo-gestagenową, poziomy TNF- $\alpha$  były wyższe niż w grupie kobiet niestosujących tej terapii [16].

Zupełnie przeciwstawne wyniki uzyskali Bernard-Poenaru i wsp., którzy w swoich badaniach odnotowali statystycznie istotny spadek wydzielania TNF- $\alpha$  przez komórki krwi obwodowej po 6 mies. stosowania HTZ [17].



Zmniejszenie produkcji wybranych cytokin pod wpływem 17 $\beta$ -estradolu, w tym również TNF- $\alpha$ , uzyskano także w badaniach *in vitro* prowadzonych na hodowlach monocytów [18].

Wspomniane wyżej prace dostarczają sprzecznych wyników odnośnie wytwarzania TNF- $\alpha$  u kobiet w okresie pomenopauzalnym stosujących HRT w porównaniu do kobiet bez tej terapii. O wiele bardziej wartościowe wydają się być badania mające na celu ocenę skutków działania tej cytokiny na wybrane komórki.

### Summary

**Objective:** To evaluate effects of selected HRT in postmenopausal women on priming of neutrophils by TNF- $\alpha$ , measured in peripheral blood using the method of chemiluminescence.

**Material and methods:** Study group consists of 46 postmenopausal women diagnosed and treated in Outpatient Clinic and Clinical Department of Gynaecology and Menopausal Diseases in our Institute. Oxidative burst of neutrophils was evaluated in 20  $\mu$ l peripheral blood sample before, after 3 and 6 months of this therapy. Oxidative burst was observed after neutrophils activation with stimulators: fMLP, PMA and zymosan with or without previous preactivation with 10 ng TNF- $\alpha$ . Chemiluminescence associated with oxidation burst was measured with Luminometr 1251, BioOrbit, Turku, Finland in stable temperature during 30 minutes (15 readings).

**Results:** After 3 months of HRT treatment priming with TNF- $\alpha$  decreased by 13, 30.4, 30.9 i 27.9%, and after 6 months by 16, 28.9, 29.9 i 27.4% ( $p < 0.0005$ ).

**Conclusions:** Hormonal replacement therapy has influence on neutrophils priming by TNF- $\alpha$ . After therapy priming is decreased.

**Key words:** neutrophils, TNF- $\alpha$ , priming, HRT

Zmniejszony *priming* neutrofilii TNF- $\alpha$  po zastosowaniu hormonalnej terapii zastępczej jest z jednej strony zjawiskiem korzystnym, ponieważ zmniejsza generację reaktywnych form tlenu przez te komórki, które to związki wykazują dobrze znane cytotoksyczne, mutagenne i rakotwórcze właściwości w starzejącym się organizmie.

Z drugiej strony, zmniejszenie *primingu* neutrofilii może powodować upośledzenie reakcji odpornościowych organizmu, a także zahamowanie apoptozy nieprawidłowych, zmutowanych komórek.

### Piśmiennictwo

1. Zeman K. The role for tumour necrosis factor- $\alpha$  in the induction of human polypolymorphonuclear neutrophil chemiluminescence. *Immunol Lett* 1996; 53: 45-50.
2. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666-70.
3. Aggarwal BB, Kohr WJ, Haas PE. Human tumour necrosis factor production, purification and characterisation. *J Biol Chem* 1985; 260: 2345-54.
4. Spies T, Morton CC, Nedospasov. Genes for the tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\beta$  are linked to human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 8699-8708.
5. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukocyte Biol* 1994; 56: 672-91.
6. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanism of action. *Mer J Med* 1994; 97: Supl 3A: S5.
7. Perussia B, Kobayashi M, Rossi ME, et al. Immune interferon enhances functional properties of human granulocytes: role of Fc receptors and effect of lymphotoxin, tumor necrosis factor and granulocyte-macrophage stimulating factor. *J Immunol* 1987; 138: 765-74.
8. Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, et al. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide: evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med* 1984; 160: 1656-71.
9. Cross AS, Lowell GH, Palmblad JC, et al. Mechanism of priming of human neutrophils by a soluble lymphoblastic cell factor. *J Immunol* 1985; 135: 2074-9.
10. Ogle JD, Noel JG, Sramkoski RM. Adhesive effect of certain cytokines and other perturbants on human neutrophils. *Inflammation* 1992; 16: 603-12.
11. Wiles ME, Dykens JA, Wright CD. Human neutrophil (PMN) oxygen radical production and cytoskeleton. *Life Sci* 1995; 57: 1533-46.
12. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin E, et al. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect. Immun* 1994; 62: 2195-201.
13. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; vol. 15, No 1: 7-10.
14. Tchórzewski H. Zapalenie – początek czy koniec choroby? *Alergia Astma Immunologia* 1996; 1: 29-34.
15. Brooks-Asplund EM, Tupper CE, Daun JM, et al. Hormonal modulation of interleukin-6, tumor necrosis factor and associated receptor secretion in postmenopausal women. *Cytokine* 2002; 19 (4): 193-200.
16. Porter VR, Greendale GA, Schocken M, et al. Immune effects of hormone replacement therapy in post-menopausal women. *Exp Gerontol* 2001; 36 (2): 311-26.
17. Bernard-Poenaru O, Roux C, Blanque R, et al. Bone-resorbing cytokines from peripheral blood mononuclear cells after hormone replacement therapy: a longitudinal study. *Osteoporos Int* 2001; 12 (9): 769-76.
18. Rogers A, Eastell R. The effect of 17 $\beta$ -estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood. *Bone* 2001; 29 (1): 30-4.

### Adres do korespondencji

Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy  
Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki  
ul. Rzgowska 281/289  
93-338 Łódź  
tel. +48 42 271 15 07  
e-mail: kgcm@interia.pl

