

Wpływ drogi podania hormonalnej terapii zastępczej na priming neutrofilii TNF- α

Influence of replacement hormonal therapy on neutrophils priming by TNF- α

Tomasz Stetkiewicz¹, Ireneusz Połać¹, Grzegorz Stachowiak¹, Sławomir Jędrzejczyk¹, Hanna Romanowicz-Makowska², Grzegorz Surkont², Tomasz Pertyński¹

TNF- α 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 neutrofilii TNF- α . W badaniach własnych udowodniono zmniejszenie nasilenia zjawiska primingu neutrofilii w czasie stosowania hormonalnej terapii zastępczej. Celem pracy jest porównanie wpływu doustnej i przezsłórkowej hormonalnej terapii zastępczej u kobiet w okresie pomenopauzalnym na priming neutrofilii TNF- α .

Słowa kluczowe: neutrofile, TNF- α , priming, Hz

(Przegląd Menopauzalny 2004; 6: 63–67)

TNF- α pełni w organizmie ludzkim rolę mediatora wielu procesów zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. Cytokina ta spełnia bardzo ważną rolę w reakcjach procesu zapalnego. Jest białkiem o masie 17 000 daltonów, w skład którego wchodzi 157 aminokwasów. Nazwa tej cytokiny wywodzi się z badań prowadzonych przez Carswella [1], który wykrył jej obecność w osoczu zwierząt po podaniu endotoksyny.

Jest jednym z najsilniejszych modyfikatorów funkcji neutrofilii [2, 3]. Ma zdolność indukcji aktywności cytostatycznej i cytotoksycznej neutrofilii w stosunku do komórek nowotworowych [4]. Neutrofile wykazują zdolność do chemotaksji, adhezji, fagocytozy i destrukcji sfagocytowanych mikroorganizmów przy pomocy mechanizmów tlenowych i pozatlenowych oraz do degranulacji i uwalniania ziarnistości wewnątrzko-

mórkowych i produktów metabolizmu tlenowego komórki. Mogą także produkować cytokiny zapalne [2]. Są jednym z najważniejszych źródeł reaktywnych form tlenu w organizmie [2].

Funkcje neutrofilii, takie jak migracja, fagocytoza, degranulacja, wytwarzanie reaktywnych form tlenu podlegają regulacji pod wpływem różnych mediatorów [2].

Stwierdzono, że pod bezpośrednim wpływem TNF- α dochodzi do zwiększonej ekspresji receptorów integrynowych neutrofila, nasilenia fagocytozy oraz do niewielkiego wzmocnienia wybuchu oddechowego [5].

Termin *priming* został wprowadzony w 1984 r. przez Guthrie i wsp. [6] do określenia zjawiska wzrostu generacji wolnych rodników przez stymulowane neutrofile po uprzedniej ich preinkubacji z lipolisacharydami. Ten

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

²Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki; kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

³Klinika 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



sam termin został zastosowany w odniesieniu do wzmożonej odpowiedzi neutrofilii na stymulatory, obserwowanej po preaktywacji czynnikiem pochodzącym z aktywowanych komórek jednojądrzastych [7]. Czynniki te zostały wyizolowane i zidentyfikowane jako TNF- α [8]. Późniejsze badania potwierdziły zdolność TNF- α do preaktywacji neutrofilii tzw. *primingu*. W wyniku preaktywacji neutrofilii przy użyciu tej cytokiny, w odróżnieniu od działania bezpośredniego, dochodziło do wzmożonej ich odpowiedzi na następny bodziec.

Opisano zwiększenie wybuchu tlenowego po inkubacji neutrofilii z TNF- α i fMLP [5]. Inne badania potwierdzały, że TNF- α sam nie aktywował wytwarzania reaktywnych form tlenu i nie nasilał agregacji i degranulacji, ale preinkubacja neutrofilii z TNF- α nasilała znacznie odpowiedź komórek na stymulatory (np. fMLP). Stwierdzono, że efekt preaktywacji zależał od stężenia TNF- α , czasu preinkubacji i temperatury otoczenia [9]. Wiles [10] opisał znaczne zwiększenie poziomu wybuchu tlenowego indukowanego fMLP, C5a, opsonizowanym zymosanem po preinkubacji neutrofilii z TNF- α . Neutrofile preinkubowane z TNF- α , w porównaniu do GM-CSF, G-CSF i IL-8 wykazywały największy poziom wybuchu oddechowego po stymulacji fMLP. Jednocześnie preaktywacja przez TNF- α najbardziej zwiększała intensywność wiązania fMLP ze swoistym receptorem na neutrofile [11].

TNF- α łączy się na powierzchni komórki z receptorami TNF-R (p55, CD120a i p75, CD120b). 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- β , LTB4, GM-CSF, G-CSF [12, 13].

W badaniach własnych udowodniono zmniejszanie nasilenia zjawiska *primingu* w czasie stosowania hormonalnej terapii zastępczej [14].

Cel pracy

Porównanie wpływu doustnej i przezskórnej hormonalnej terapii zastępczej u kobiet w okresie pomenopauzalnym na *priming* neutrofilii TNF- α .

Metodyka

Badaną grupę stanowiło 89 pomenopauzalnych pacjentek Poradni Kliniki Ginekologii i Chorób Menopauzy ICZMP w Łodzi.

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

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

Pacjentki zakwalifikowano do hormonalnej terapii zastępczej. U 46 pacjentek zastosowano HTZ doustną zawierającą 17-beta-estradiol i octan norethisteronu. U 43 kobiet włączono terapię przezskórną, składającą się z mikronizowanego estradiolu i octanu 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 neutrofilii zastosowano następujące stymulatory: formylo-metionilo-leucylofenyloalanina (fMLP), octan mirystynianu forbolu (PMA) i zymosan firmy Sigma-Aldrich. Jako wzmacniacza chemiluminescencji bezpośrednio użyto luminolu (Sigma-Aldrich). Do preaktywacji (*primingu*) neutrofilii używano rekombinowanego ludzkiego TNF- α (5×10^7 U/mg) (Sigma-Aldrich). Płyn PBS (fizjologiczny roztwór NaCl zbufozony fosforanami) pochodził z firmy Biomed.

Pomiaru chemiluminescencji dokonywano przy użyciu aparatu LUMINOMETR 1251 (Pharmacia LKB). Badania przeprowadzano w stałej temp. $37^\circ\text{C} \pm 0,1$. 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 μl krwi pełnej, – 20 μl luminolu, – 20 μl PBS (BS), lub 20 μl fMLP (2×10^{-6} M/ml), lub 20 μl PMA (2×10^{-8} M/ml) lub 30 μl zymosanu (10 mg/ml), – PBS do łącznej objętości 1 000 μl . Próbkę w których oceniano wybuch tlenowy neutrofilii preaktywowanych były inkubowane przez 30 min z TNF- α (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

Porównując preaktywację TNF- α w grupach stosujących różne rodzaje terapii, interakcje pomiędzy czasem stosowania HTZ a drogą jej podania wystąpiły tylko w przypadku CL spontanicznej (tab. I). Analizując



Tab. I. Preaktywacja neutrofilii TNF- α w zależności od rodzaju terapii HTZ (doustna/przezsórná) i okresu jej stosowania

Parametry chemiluminescencji	Parametry statystyczne	Okres stosowania HTZ			
		0	3 mies.	6 mies.	
Stosunek pól = po preaktywacji/bez preaktywacji	BS ^{b,c} HTZ doustna (n=46)	średnia±SD	1,01±0,33	1,09±0,27	1,09±0,33
		minimum÷maks.	0,85÷1,11	1,08÷1,44	0,89÷1,53
	HTZ przezsórná (n=43)	średnia±SD	1,54±0,73	1,18±0,50	1,11±0,27
		minimum÷maks.	1,14÷1,96	0,67÷1,74	0,80÷1,16
	fMLP ^b HTZ doustna (n=46)	średnia±SD	1,90±0,41	1,38±0,27	1,36±0,29
		minimum÷maks.	1,29÷2,85	0,98÷2,13	1,03÷2,41
HTZ przezsórná (n=43)	średnia±SD	1,97±0,53	1,33±0,30	1,41±0,25	
	minimum÷maks.	1,32÷3,47	0,72÷2,07	1,02÷1,98	
PMA ^b HTZ doustna (n=46)	średnia±SD	1,83±0,34	1,31±0,15	1,32±0,40	
	minimum÷maks.	1,31÷2,49	0,93÷1,56	0,97÷3,07	
HTZ przezsórná (n=43)	średnia±SD	2,05±0,65	1,37±0,25	1,40±0,29	
	minimum÷maks.	1,41÷4,24	0,98÷1,89	1,02÷2,21	
Z ^b HTZ doustna (n=46)	średnia±SD	1,79±0,37	1,34±0,27	1,25±0,20	
	minimum÷maks.	1,21÷2,43	1,00÷2,03	1,03÷1,93	
HTZ przezsórná (n=43)	średnia±SD	1,78±0,44	1,24±0,28	1,34±0,36	
	minimum÷maks.	1,21÷3,02	0,22÷1,65	1,04÷2,69	
Stosunek pików=po preaktywacji / bez preaktywacji	BS ^{a,b,c} HTZ doustna (n=46)	średnia±SD	1,03±0,31	0,59±0,31	1,07±0,38
		minimum÷maks.	0,76÷1,05	0,19÷1,12	0,76÷1,64
	HTZ przezsórná (n=43)	średnia±SD	1,57±0,77	0,89±0,44	1,21±0,37
		minimum÷maks.	1,26÷1,95	0,16÷1,8	0,79÷1,43
	fMLP ^b HTZ doustna (n=46)	średnia±SD	1,96±0,44	1,36±0,41	1,65±1,23
		minimum÷maks.	1,28÷2,78	0,87÷2,88	0,89÷7,12
HTZ przezsórná (n=43)	średnia±SD	1,97±0,65	1,37±0,44	1,40±0,32	
	minimum÷maks.	1,11÷3,59	0,75÷2,48	0,67÷2,01	
PMA ^b HTZ doustna (n = 46)	średnia±SD	1,77±0,50	1,24±0,27	1,46±0,52	
	minimum÷maks.	0,84÷3,00	0,64÷1,71	0,73÷2,97	
HTZ przezsórná (n=43)	średnia±SD	1,97±1,00	1,35±0,34	1,41±0,45	
	minimum÷maks.	1,08÷5,10	0,88÷2,30	0,82÷2,44	
Z ^b HTZ doustna (n=46)	średnia±SD	1,71±0,40	1,24±0,29	1,24±0,31	
	minimum÷maks.	1,05÷2,60	0,64÷1,82	0,62÷2,13	
HTZ przezsórná (n=43)	średnia±SD	1,69±0,47	1,12±0,35	1,37±0,41	
	minimum÷maks.	1,21÷2,80	0,21÷1,91	0,86÷2,84	

BS – bez stymulacji; fMLP – stymulacja formylo-metionilo-leucylofenyloalaniną; PMA – stymulacja octanem mirystynianu forbolu; Z – stymulacja zymosanem
^a – wartości parametrów różnią się w zależności od rodzaju terapii HTZ (p<0,05),
^b – wartości parametrów zmieniają się w sposób istotny statystycznie w czasie stosowania HTZ (p<0,05),
^c – istnieje interakcja między czasem stosowania HTZ i rodzajem terapii HTZ (doustna/przezsórná) (p<0,05)

Stosunki pól wykazano, że preaktywacja w przypadku drogi przezsórnéj HTZ malała w czasie, a przy zastosowaniu drogi doustnej nieznacznie wzrastała.

Przy analizie stosunków wartości maksymalnych stwierdzono, że preaktywacja po zastosowaniu drogi

przezsórnéj malała w pierwszych 3 mies. stosowania HTZ szybciej niż w grupie z terapią doustną, a w następných 3 mies. wzrastała wolniej. Z drugiej strony wartości preaktywacji były niższe u kobiet stosujących terapię doustną.



Dyskusja

Porównując preaktywację neutrofili u pacjentek stosujących terapię doustną i terapię przezskórną stwierdzono tylko pewne nieznaczne różnice, m.in. interakcje, które nie upoważniają do ustalenia ogólniejszych trendów i zależności. Preaktywacja neutrofili TNF- α nie zależy zatem od drogi podania hormonoterapii zastępczej.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono odniesień do powyższej zależności. Jedynie McManus i wsp. prowadzili porównawcze badania hormonalnej terapii doustnej i przezskórnej, oceniając wpływ różnych dróg podania HRT na metabolizm reaktywnych form tlenu (ROI) [15]. Nie oceniali oni jednak zjawisk związanych z generacją ROI, takich jak priming, ale wtórne efekty tych cząsteczek (peroksydację lipidów).

Dostępne badania nad TNF- α dotyczą natomiast tylko jednego rodzaju terapii, doustnej bądź przezskórnej. Brooks-Asplund i wsp. stwierdzili 2-krotny wzrost stężenia TNF- α po zastosowaniu zarówno terapii estrogenowej, jak i estrogenowo-gestagenowej [16].

Podobnie w badaniach Porter i wsp. w grupie 27 kobiet pomenopauzalnych stosujących HRT estrogenowo-gestagenową poziomy TNF- α były wyższe niż w grupie kobiet niestosujących tej terapii [17].

Zupełnie przeciwstawne wyniki uzyskali Bernard-Poenaru i wsp., którzy w swoich badaniach odnotowali statystycznie istotny spadek wydzielania TNF- α przez komórki krwi obwodowej po 6 mies. HTZ [18].

Zmniejszenie produkcji wybranych cytokin pod wpływem 17-beta-estradolu, w tym również TNF- α , uzyskano także w badaniach *in vitro* prowadzonych na hodowlach monocytów [19].

Summary

Objective: To compare effects of oral and transdermal HRT in postmenopausal women on priming of neutrophils by TNF- α , measured in peripheral blood using the method of chemiluminescence.

Material and methods: Study group consists of postmenopausal women diagnosed and treated in Outpatient Clinic and Clinical Department of Gynaecology and Menopausal Diseases in our institute. 46 women were treated oral HTR and 43 women were on transdermal HRT. Oxydative burst of neutrophils was evaluated in 20 μ l peripheral blood sample before, after 3 and 6 months of this therapy. Oxydative burst was observed after neutrophils activation with stimulators: fMLP, PMA and zymosan with or without previous preactivation with 10 ng TNF- α . Chemiluminescence associated with oxydation burst was measured with Luminometer 1251, BioOrbit, Turku, Finland in stable temperature during 30 minutes (15 readings).

Result and Conclusions: Decreasing effect of HRT on priming of neutrophils by TNF- α did not depend on which way was HRT administrated.

Key words: neutrophils, TNF- α , priming, HRT

Piśmiennictwo

1. 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: 3666-3670.
2. Zeman K. The role for tumour necrosis factor- α in the induction of human polypolymorphonuclear neutrophil chemiluminescence. Immunol Lett 1996; 53: 45-50.
3. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. J Leukocyte Biol 1994; 56: 672-91.
4. Spies T, Morton CC, Nedospasov. Genes for the tumor necrosis factor α and β are linked to human major histocompatibility complex. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 8699-708.
5. Perusia 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.
6. 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.
7. 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.
8. Aggarwal BB, Kohr WJ, Haas PE. Human tumour necrosis factor production, purification and characterisation. J Biol Chem 1985; 260: 2345-54.
9. Ogle JD, Noel JG, Sramkoski RM. Adhesive effect of certain cytokines and other perturbants on human neutrophils. Inflammation 1992; 16: 603-12.
10. Wiles ME, Dykens JA, Wright CD. Human neutrophil (PMN) oxygen radical production and cytoskeleton. Life Sci 1995; 57: 1533-46.



11. 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.
12. Buttke TM, Sandstrom PA. *Oxidative stress as a mediator of apoptosis*. *Immunol Today* 1994; vol. 15, No 1: 7-10.
13. Tchórzewski H. *Zapalenie – początek czy koniec choroby?* *Alergia Astma Immunologia* 1996; 1: 29-34.
14. Stetkiewicz T, Połać I, Stachowiak G i wsp. *Hormonalna terapia zastępcza u kobiet po menopauzie a wybrane funkcje neutrofilii – preaktywacja TNF- α* . *Przeegl Men* 2004; 5: 63-66.
15. Mc Manus J, Mc Eneny J, Thompson W, Young IS. *The effect of hormone replacement therapy on the oxidation of low density. Atherosclerosis*. 1997; 135 (1): 73-81.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Rogers A, Eastell R. *The effect of 17beta-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood*. *Bone* 2001; 29 (1): 30-4.

Adres do korespondencji

dr n. med. Tomasz Stetkiewicz
 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

