Preaktywacja neutrofili TNF-α u kobiet z zaburzeniami gospodarki lipidowej stosujących hormonalną terapię zastępczą

TNF-α preactivation of neutrophils in women with lipids metabolism disturbances using hormonal replacement therapy

Tomasz Stetkiewicz[1], Grzegorz Stachowiak[1], Grzegorz Surkont[2], Hanna Romanowicz-Makowska[3], Tomasz Pertyński[1]

Estrogeny stosowane w hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) zmniejszają zjawisko preaktywacji (primingu) neutrofili TNF-α. W pracy oceniano wpływ złożonej ciągłej hormonalnej terapii zastępczej u kobiet po menopauzie na preaktywację TNF-α neutrofili krwi obwodowej w grupach kobiet z zaburzeniami gospodarki lipidowej i z prawidłowym lipidogramem.

Słowa kluczowe: *hormonalna terapia zastępcza, neutrofile, TNF-α, priming, zaburzenia gospodarki lipidowej*

(Przegląd Menopauzalny 2005; 3: 58–64)

Wstęp

Udowodniony został hamujący wpływ estrogenów na zjawisko oksydacyjnej modyfikacji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), który to proces prowadzi do wzrostu ich aterogenności i zwiększenia ryzyka chorób układu krążenia [1–3].

Działanie antyoksydacyjne estrogenów w stosunku do lipoprotein dotyczy także i ochronnego działania tych hormonów w stosunku do struktur błonowych [1, 4, 5]. Prawidłowy status *red-ox* enzymów i receptorów błonowych zapewnia ich normalną, fizjologiczną funkcję.

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 [6]. Są jednym z najważniejszych źródeł reaktywnych form tlenu w organizmie [6].

Neutrofile w organizmie ludzkim pełnią niezwykle istotną rolę we wczesnej odpowiedzi skierowanej przeciwko organizmom patogennym ze środowiska zewnętrznego, zjawiając się jako pierwsze komórki

[1] Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński
[2] Poradnia Uroginekologiczna, Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Jacek Suzin
[3] Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

w miejscu toczącego się procesu zapalnego [6]. Cechuje je krótki czas życia, duża aktywność biologiczna i duża zdolność do migracji. Codziennie ok. 100 mln neutrofili opuszcza krążenie, ulegając apoptozie, a na ich miejsce trafiają nowe komórki [6].

Funkcje neutrofili, takie jak migracja, fagocytoza, degranulacja, wytwarzanie reaktywnych form tlenu podlegają regulacji pod wpływem różnych mediatorów [6]. Jednym z takich mediatorów jest TNF-α. TNF-α – czynnik martwicy guzów (ang. *tumor necrosis factor*) jest białkiem o masie 17 tys. daltonów, w skład którego wchodzi 157 aminokwasów. Nazwa tej cytokiny wywodzi się z badań prowadzonych przez Carswella [7], 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 [8]. Z dalszych osiągnięć badawczych dotyczących TNF-α należy wspomnieć o ustaleniu sekwencji aminokwasów wchodzących w jego skład oraz zmapowaniu jego genu w 6. parze chromosomów [9].

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 neutrofili [6, 10]. Ma zdolność indukcji aktywności cytostatycznej i cytotoksycznej neutrofili w stosunku do komórek nowotworowych [11].

Stwierdzono, że pod bezpośrednim wpływem TNF-α dochodzi do zwiększonej ekspresji receptorów integrynowych neutrofila, nasilenia fagocytozy oraz do niewielkiego wzmocnienia wybuchu oddechowego [12].

Termin *priming* został wprowadzony w 1984 r. przez Guthrie i wsp. [13] do określenia zjawiska wzrostu generacji wolnych rodników przez stymulowane neutrofile po uprzedniej ich preinkubacji z lipolisacharydami. Ten sam termin został zastosowany w odniesieniu do wzmożonej odpowiedzi neutrofili na stymulatory, obserwowanej po preaktywacji czynnikiem pochodzącym z aktywowanych komórek jednojądrzastych [14]. Czynnik ten został wyizolowany i zidentyfikowany jako TNF-α [8]. Późniejsze badania potwierdziły zdolność TNF-α do preaktywacji neutrofili tzw. *primingu*. W wyniku preaktywacji neutrofili przy użyciu tej cytokiny, w odróżnieniu od działania bezpośredniego, dochodziło do wzmożonej ich odpowiedzi na następny bodziec.

Opisano zwiększenie wybuchu tlenowego po inkubacji neutrofili z TNF-α i fMLP [12]. Inne badania potwierdzały, że TNF-α sam nie aktywował wytwarzania reaktywnych form tlenu i nie nasilał agregacji i degranulacji, ale preinkubacja neutrofili 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 [15]. Wiles [16] opisał znaczne zwiększenie poziomu wybuchu tlenowego indukowanego fMLP, C5a, opsonizowanym zymosanem po preinkubacji neutrofili 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 neutrofilu [17].

TNF-α łączy się na powierzchni komórki z receptorami TNF-R (p55, CD120a i p75, CD120b). Badania Zemana i wsp. [6] dostarczają wielu informacji o roli ww. 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-β, LTB4, GM-CSF, G-CSF. Dochodzi także do wzrostu ekspresji receptorów powierzchniowych, takich jak integryny CD11/CD14 [18, 19].

Cel pracy

Ocena wpływu złożonej ciągłej hormonalnej terapii zastępczej u kobiet po menopauzie na preaktywację (*priming*) TNF-α neutrofili krwi obwodowej w grupach kobiet z zaburzeniami gospodarki lipidowej i z prawidłowym lipidogramem.

Materiał i metody

Badaną grupę stanowiło 29 kobiet z hipercholesterolemią (średnia wieku 54,3±5,0 lat) i 30 kobiet z hiperlipidemią (średnia wieku 54,6±4,8 lat) (hipercholestrolemią lub hipertrójglicerydemią) w okresie pomenopauzalnym. Grupę porównawczą stanowiło 27 kobiet z prawidłowym lipidogramem (średnia wieku 53,8±5,2 lat).

Były one pacjentkami Poradni Kliniki Ginekologii i Chorób Menopauzy ICZMP w Łodzi.

Kryteriami wykluczającymi były: istnienie przeciwwskazań do hormonalnej terapii zastępczej, ostre lub przewlekłe choroby zapalne, cukrzyca, stosowanie leków o właściwościach antyoksydacyjnych i 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 17-beta-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 neutrofili zastosowano następujące stymulatory: formylo-metionylo-leucylofenyloalanina (fMLP), octan mirystynianu forbolu (PMA) i zymosan firmy Sigma-Aldrich. Jako wzmacniacza chemiluminescencji bezpośredniej użyto luminolu (Sigma-Aldrich). Do preaktywacji (*primingu*) neutrofili używano rekombinowanego ludzkiego TNF-α ($5x10^7$ 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). Badania przeprowadzano w stałej temperaturze 37°C±0,1. Luminometr w ciągu 30 min dokonywał 15 pomiarów. Każdą serię pomiarów wykonywano na czterech 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 neutrofili. Próbki, w których oceniano wybuch tlenowy neutrofili spoczynkowych zawierały: – 20 µl krwi pełnej, – 20 µl luminolu, – 20 µl PBS (BS), lub 20 µl fMLP ($2x10^{-6}$ M/ml), lub 20 µl PMA ($2x10^{-8}$M/ml) lub 30 µl zymosanu (10 mg/ml), – PBS do łącznej objętości 1 000 µl. Próbki, w których oceniano wybuch tlenowy neutrofili 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

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

Preaktywacja neutrofili TNF-α wyrażona stosunkiem pól pod krzywymi chemiluminescencji nie wykazywała różnic istotnych statystycznie w porównaniach grup kobiet z hipercholesterolemią i prawidłowym poziomem cholesterolu całkowitego, dla wszystkich stymulatorów, zarówno przed rozpoczęciem terapii substytucyjnej, jak i w jej trakcie (tab. I).

Preaktywacja neutrofili TNF-α wyrażona stosunkiem wartości maksymalnych chemiluminescencji nie wykazywała różnic istotnych statystycznie w porównaniach grup kobiet z hipercholesterolemią i prawidłowym poziomem cholesterolu całkowitego, dla wszystkich stymulatorów z wyjątkiem zymosanu, zarówno przed rozpoczęciem terapii substytucyjnej, jak i w jej trakcie. W przypadku stymulacji zymosanem stwierdzono interakcję między czasem stosowania HTZ i występowaniem hipercholesterolemii. U pacjentek z prawidłowymi poziomami cholesterolu całkowitego preaktywacja obniżała się przez cały czas stosowania HTZ, natomiast w przypadku hipercholesterolemii przez pierwsze 3 mies. następował spadek, a przez następne 6 mies. wzrost preaktywacji (tab. I).

Preaktywacja neutrofili TNF-α wyrażona stosunkiem pól pod krzywymi chemiluminescencji nie wykazywała różnic istotnych statystycznie między grupami kobiet z hiperlipidemią i prawidłowym poziomem cholesterolu całkowitego i trójglicerydów, dla wszystkich stymulatorów zarówno przed rozpoczęciem terapii substytucyjnej, jak i w jej trakcie (tab. II).

Preaktywacja neutrofili TNF-α wyrażona stosunkiem wartości maksymalnych chemiluminescencji nie wykazywała różnic istotnych statystycznie w porównaniach grup kobiet z hiperlipidemią i prawidłowym poziomem cholesterolu całkowitego i trójglicerydów, dla wszystkich stymulatorów z wyjątkiem zymosanu zarówno przed rozpoczęciem terapii substytucyjnej, jak i w jej trakcie. W przypadku stymulacji zymosanem stwierdzono interakcję między czasem stosowania HTZ i występowaniem hiperlipidemii. U pacjentek z prawidłowymi poziomami cholesterolu całkowitego i trójglicerydów preaktywacja obniżała się przez cały czas stosowania HTZ, natomiast w przypadku hiperlipidemii przez pierwsze 3 mies. następował spadek, a przez następne 6 mies. wzrost preaktywacji (tab. II).

Dyskusja

Peroksydacja lipidów, a zwłaszcza frakcji LDL cholesterolu jest dobrze poznanym bezpośrednim skutkiem działania patologicznego reaktywnych form tlenu w organizmie. Jak wspomniano wcześniej, produkty peroksydacji lipidów mają działanie aterogenne, zwiększając ryzyko choroby niedokrwiennej serca. U osób z grupy ryzyka rozwoju miażdżycy, u których występuje hipercholesterolemia lub podwyższone poziomy trójglicerydów dochodzi do nasilonej peroksydacji lipidów. Nasuwa się pytanie czy istnieje związek między występowaniem zaburzeń gospodarki lipidowej w organizmie a nadmierną generacją wolnych rodników.

Wykazano, że już 3-miesięczne stosowanie hormonoterapii zastępczej powoduje zmniejszenie zjawiska *primingu* neutrofili. Stwierdzona zależność nie znajduje odniesień w piśmiennictwie. W pracy dokonano porównania wpływu złożonej ciągłej hormonalnej terapii zastępczej

Tab. I. Preaktywacja TNF-α w zależności od występowania hipercholesterolemii i czasu stosowania HTZ

Parametry chemiluminescencji			Parametry statystyczne	Okres stosowania HTZ		
				0	3 mies.	6 mies.
pole pod krzywą	BS[b]	norma (n=27)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,35 ± 0,7 0,53 ÷ 1,96	1,18 ± 0,44 1,08 ÷ 1,67	1,14 ± 0,29 0,89 ÷ 1,20
		hiperchole-sterolemia (n=29)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,28 ± 0,54 1,14 ÷ 1,57	1,10 ± 0,36 0,67 ÷ 1,74	1,07 ± 0,31 0,80 ÷ 1,53
	FMLP[b]	norma (n=27)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,81 ± 0,43 1,29 ÷ 2,85	1,37 ± 0,33 1,06 ÷ 2,13	1,36 ± 0,21 1,05 ÷ 1,94
		hiperchole-sterolemia (n=29)	średnia ± SD min ÷ maks.	2,01 ± 0,48 1,32 ÷ 3,47	1,34 ± 0,26 0,72 ÷ 1,93	1,40 ± 0,30 1,02 ÷ 2,41
	PMA[b]	norma (n=27)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,91 ± 0,44 1,31 ÷ 2,61	1,27 ± 0,22 0,93 ÷ 1,88	1,34 ± 0,27 0,97 ÷ 2,11
		hiperchole-sterolemia (n=29)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,95 ± 0,57 1,41 ÷ 4,24	1,38 ± 0,19 0,98 ÷ 1,89	1,37 ± 0,39 1,02 ÷ 3,07
	Z[b]	norma (n=27)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,78 ± 0,36 1,25 ÷ 2,42	1,30 ± 0,25 1,06 ÷ 2,03	1,22 ± 0,16 1,03 ÷ 1,69
		hiperchole-sterolemia (n=29)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,79 ± 0,42 1,21 ÷ 3,02	1,29 ± 0,30 0,22 ÷ 1,81	1,34 ± 0,33 1,04 ÷ 2,69
wartość maksymalna	BS[b]	norma (n=27)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,33 ± 0,70 0,76 ÷ 1,95	0,69 ± 0,35 0,19 ÷ 1,37	1,24 ± 0,47 1,11 ÷ 1,64
		hiperchole-sterolemia (n=29)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,26 ± 0,59 1,25 ÷ 1,85	0,76 ± 0,43 0,16 ÷ 1,80	1,07 ± 0,30 0,76 ÷ 1,33
	FMLP[b]	norma (n=27)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,83 ± 0,42 1,28 ÷ 2,78	1,39 ± 0,54 0,87 ÷ 2,88	1,38 ± 0,27 0,89 ÷ 2,01
		hiperchole-sterolemia (n=29)	średnia ± SD min ÷ maks.	2,04 ± 0,60 1,11 ÷ 3,59	1,34 ± 0,34 0,75 ÷ 2,35	1,62 ± 1,13 0,67 ÷ 7,12
	PMA[b]	norma (n=27)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,64 ± 0,57 0,84 ÷ 3,00	1,27 ± 0,27 0,71 ÷ 1,83	1,36 ± 0,47 0,73 ÷ 2,44
		hiperchole-sterolemia (n=29)	średnia ± SD min ÷ maks.	2,00 ± 0,86 1,08 ÷ 5,10	1,30 ± 0,34 0,64 ÷ 2,30	1,47 ± 0,49 0,82 ÷ 2,97
	Z[b,c]	norma (n=27)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,63 ± 0,40 1,05 ÷ 2,60	1,29 ± 0,31 0,72 ÷ 1,91	1,16 ± 0,21 0,62 ÷ 1,48
		hiperchole-sterolemia (n=29)	średnia ± SD min ÷ maks.	1,74 ± 0,45 1,18 ÷ 2,80	1,12 ± 0,32 0,21 ÷ 1,82	1,39 ± 0,41 0,86 ÷ 2,84

BS – bez stymulacji
fMLP – stymulacja formylo-metionylo-leucylofenyloalaniną
PMA – stymulacja octanem mirystynianu forbolu
Z – stymulacja zymosanem
Zastosowano jednoczynnikową i dwuczynnikową analizę wariancji dla zmiennych zależnych
[b] – wartości parametrów zmieniają się w sposób istotny statystycznie w czasie stosowania HTZ (p<0,05)
[c] – istnieje interakcja między czasem stosowania HTZ i występowaniem hipercholesterolemii (p<0,05)

Tab. II. Preaktywacja TNF-α w zależności od występowania hiperlipidemii i czasu stosowania HTZ

Parametry chemiluminescencji		Parametry statystyczne	Okres stosowania HTZ		
			0	3 mies.	6 mies.
BS[b]	norma (n=27)	średnia ± SD	1,36 ± 0,72	1,22 ± 0,44	1,15 ± 0,30
		min ÷ maks.	0,85 ÷ 1,96	1,08 ÷ 1,67	0,89 ÷ 1,21
	hiperlipidemia (n=30)	średnia ± SD	1,27 ± 0,53	1,09 ± 0,37	1,01 ± 0,30
		min ÷ maks.	1,14 ÷ 1,57	0,67 ÷ 1,74	0,80 ÷ 1,53
FMLP[b]	norma (n=27)	średnia ± SD	1,83 ± 0,44	1,37 ± 0,34	1,36 ± 0,21
		min ÷ maks.	1,29 ÷ 2,85	1,06 ÷ 2,13	1,05 ÷ 1,94
	hiperlipidemia (n=30)	średnia ± SD	1,99 ± 0,49	1,34 ± 0,26	1,40 ± 0,29
		min ÷ maks.	1,32 ÷ 3,47	0,72 ÷ 1,93	1,02 ÷ 2,41
PMA[b]	norma (n=27)	średnia ± SD	1,90 ± 0,45	1,26 ± 0,22	1,34 ± 0,20
		min ÷ maks.	1,31 ÷ 2,61	0,93 ÷ 1,88	0,97 ÷ 2,11
	hiperlipidemia (n=30)	średnia ± SD	1,96 ± 0,56	1,38 ± 0,19	1,37 ± 0,39
		min ÷ maks.	1,41 ÷ 4,24	0,98 ÷ 1,89	1,02 ÷ 3,07
Z[b]	norma (n=27)	średnia ± SD	1,81 ± 0,34	1,32 ± 0,25	1,22 ± 0,16
		min ÷ maks.	1,34 ÷ 2,42	1,08 ÷ 2,03	1,03 ÷ 1,69
	hiperlipidemia (n=30)	średnia ± SD	1,77 ± 0,43	1,28 ± 0,29	1,34 ± 0,33
		min ÷ maks.	1,21 ÷ 3,02	0,22 ÷ 1,81	1,04 ÷ 2,69
BS[b]	norma (n=27)	średnia ± SD	1,37 ± 0,72	0,66 ± 0,35	1,25 ± 0,49
		min ÷ maks.	0,76 ÷ 1,95	0,19 ÷ 1,37	1,11 ÷ 1,64
	hiperlipidemia (n=30)	średnia ± SD	1,25 ± 0,59	0,77 ± 0,43	1,08 ± 0,30
		min ÷ maks.	1,26 ÷ 1,85	0,16 ÷ 1,80	0,76 ÷ 1,33
FMLP[b]	norma (n=27)	średnia ± SD	1,82 ± 0,43	1,40 ± 0,55	1,37 ± 0,28
		min ÷ maks.	1,28 ¸ 2,78	0,87 ¸ 2,88	0,89 ¸ 2,01
	hiperlipidemia (n=30)	średnia ± SD	2,04 ± 0,59	1,34 ± 0,34	1,61 ± 1,11
		min ÷ maks.	1,11 ¸ 3,59	0,75 ¸ 2,35	0,67 ¸ 7,12
PMA[b]	norma (n=27)	średnia ± SD	1,67 ± 0,57	1,26 ± 0,28	1,36 ± 0,48
		min ÷ maks.	0,84 ¸ 3,00	0,71 ¸ 1,83	0,73 ¸ 2,44
	hiperlipidemia (n=30)	średnia ± SD	1,97 ± 0,86	1,31 ± 0,33	1,47 ± 0,48
		min ÷ maks.	1,08 ÷ 5,10	0,64 ÷ 2,30	0,82 ÷ 2,97
Z[b,c]	norma (n=27)	średnia ± SD	1,65 ± 0,40	1,30 ± 0,31	1,15 ± 0,21
		min ÷ maks.	1,05 ÷ 2,60	0,72 ÷ 1,91	0,62 ÷ 1,48
	hiperlipidemia (n=30)	średnia ± SD	1,72 ± 0,45	1,12 ± 0,32	1,38 ± 0,40
		min ÷ maks.	1,18 ÷ 2,80	0,21 ÷ 1,82	0,86 ÷ 2,84

BS – bez stymulacji
fMLP – stymulacja formylo-metionylo-leucylofenyloalaniną
PMA – stymulacja octanem mirystynianu forbolu
Z – stymulacja zymosanem

Zastosowano jednoczynnikową i dwuczynnikową analizę wariancji dla zmiennych zależnych
[b] – wartości parametrów zmieniają się w sposób istotny statystycznie w czasie stosowania HTZ
[c] – istnieje interakcja między czasem stosowania HTZ i występowaniem hiperlipidemii

u kobiet po menopauzie na preaktywację (*priming*) TNF-α neutrofili krwi obwodowej w grupach kobiet z hipercholesterolemią i prawidłowym poziomem cholesterolu całkowitego oraz w grupach kobiet z hiperlipidemią i prawidłowymi poziomami cholesterolu całkowitego i trójglicerydów. Nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych w generacji reaktywnych form tlenu w wymienionych grupach z zaburzeniami gospodarki lipidowej w porównaniu z grupą kontrolną przed rozpoczęciem hormonalnej terapii zastępczej. Oceniając wpływ HTZ na preaktywację TNF-α neutrofili w wymienionych grupach, w przypadku niektórych parametrów CL, zaobserwowano interakcje pomiędzy czasem stosowania HTZ a wielkością tej preaktywacji. W trakcie stosowania HTZ spadek *primingu* był wtedy szybszy w grupach z hipercholesterolemią i hiperlipidemią w porównaniu z grupą z normalnymi poziomami. Interakcje te nie pozwalają jednak na wyprowadzenie ogólniejszych zależności.

Kim i wsp. [20] odnotowali u królików z hipercholesterolemią podwyższenie aktywności enzymów wymiatających wolne rodniki.

Lizard i wsp. [21] wykazali, że w surowicy kobiet z hipercholesterolemią często dochodzi do podwyższenia poziomów oksysteroli, stanowiących induktory apoptozy.

Poza tym u pacjentów z hipercholesterolemią stwierdzono podwyższone stężenie F_2-izoprostanów, wytwarzanych z kwasu arachidonowego w procesie peroksydacji lipidów.

Podaż witaminy E hamowała wzrost poziomu F2-izoprostanów [22].

Badania nad pacjentami z tzw. rodzinną hipercholesterolemią ujawniły u nich zwiększoną peroksydację LDL na podstawie oceny skoniugowanych dienów [23]

Ting wsp. [24] wykazali, że witamina C podawana pacjentom z hipercholesterolemią poprawia rozszerzalność naczyń w przedramieniu. Witamina C usuwa wolne rodniki, które inaktywują uwalniany ze śródbłonka NO o właściwościach naczyniorozszerzających.

Według Rabaud i wsp. [25] w hipertrójglicerydemii można zaobserwować zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu.

Potwierdzają to również badania Picarda [26], wykazujące wzrost peroksydacji LDL u pacjentów z podwyższonymi poziomami trójglicerydów.

Natomiast nie znaleziono w piśmiennictwie doniesień o badaniu wpływu estrogenów na zjawisko *primingu* TNF-α neutrofili w grupach kobiet z zaburzeniami gospodarki lipidowej.

Zmniejszony *priming* neutrofili TNF-α 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* neutrofili może powodować upośledzenie reakcji odpornościowych organizmu, a także zahamowanie apoptozy nieprawidłowych, zmutowanych komórek.

Wniosek

Wpływ hormonalnej terapii zastępczej na zjawisko preaktywacji neutrofili TNF-α nie jest zależny od zaburzeń gospodarki lipidowej.

Summary

Lipids peroxidation, especially LDL cholesterol is well known effect of reactive oxygen intermediates (ROI) activity in organism. Lipids peroxidation products have ahterogenic activity, increasing ischaemic heart disease risk

Aim of study: *Comparison of hormonal replacement therapy on priming of neutrophils by TNF-α, measured in peripheral blood using the method of chemiluminescency in groups of women with lipids metabolism disturbances and normal lipids values.*

Material and methods: *Study group consists of 29 women with hipercholesterolaemia (mean age 54.3÷5.0) and 29 women with hiperlipidaemia (hipercholesterolaemia or hipertriglyceridaemia (mean age 54.6÷4.8). Control group includes 27 women with normal lipids concentrations (mean age 53.8÷5.2). Oxydative burst of neutrophils was evaluated in 20α l peripheral blood sample before, after 3 and 6 months of this therapy. Oxydative burst was observed after neutrophils acivation with stimulators: fMLP, PMA and zymosan with or without previous preactivation with 10 ng. TNF-α. Chemiluminescency associated with oxydation burst was measured with Luminometr 1251, BioOrbit, Turku, Finland in stable temperature during 30 minutes (15 readings).*

Results: *Evaluating HRT influence on neutrophils priming by TNF-α in mentioned groups in case of some chemiluminescence parameters, interactions between HRT duration and priming were observed. During HRT decrease of neutrophils priming was faster in groups*

with hipercholesterolaemia and hipertriglyceridaemia than in women with normal lipids concentrations. This interactions do not allow to conclude general relations.

Conclusion: *Priming of neutrophils by TNF-α does not depend on lipids metabolism disturbances.*

Key words: *hormonal replacement therapy, neutrophils, TNF-α, priming, lipids metabolism disturbances*

Piśmiennictwo

1. Clemente C, Caruso MG, Berloco P, et al. *Antioxidant effect of short-term hormonal treatment in postmenopausal women.* Maturitas 1999, 31: 137-42.
2. McManus J, Mc Eneney J, Young IS, et al. *The effect of various oestrogens and progestogens on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in vitro.* Maturitas 1996, 25 (2): 125-31.
3. Sack MN, Rader DJ, Cannon III RO: *Estrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women.* Lancet, 1994; 343: 269-70.
4. Keller JN, Germeyer A Begley JGAD: *17Beta-estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na+/K+-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid beta-peptide and iron.* J Neurosci Res 1997; 15, 50 (4): 522-30.
5. Tranquilli AL, Mazzanti L, Cugini M, et al *Transdermal estradiol and medroxyprogesterone acetate in hormone replacement therapy are both antioxidants.* Gynecol Endocrinol 1995; 9: 137-41.
6. Zeman K. *The role for tumour necrosis factor-α in the induction of human polypolymorphonuclear neutrophil chemiluminescence.* Immunol Lett 1996; 53: 45-50.
7. 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.
8. Aggarwal BB, Kohr WJ, Haas PE. *Human tumour necrosis factor production, purification and characterisation.* J Biol Chem 1985; 260: 2345-54.
9. Spies T, Morton CC, Nedospasov. *Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex.* Natl Acad Sci USA, 1986; 83: 8699-708.
10. Smith JA. *Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword.* J Leukocyte Biol 1994; 56: 672-91.
11. Frei B. *Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanism of action.* Mer J Med 1994; 97: Supl 3A: S5.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Ogle JD, Noel JG, Sramkoski RM. *Adhesive effect of certain cytokines and other perturbants on human neutrophils.* Inflammation 1992; 16: 603-12.
16. Wiles ME, Dykens JA, Wright CD. *Human neutrophil (PMN) oxygen radical production and cytoskeleton.* Life Sci 1995; 57: 1533-46.
17. 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.
18. Buttke TM, Sandstrom PA. *Oxidative stress as a mediator of apoptosis.* Immunol Today 1994; vol. 15, No 1: 7-10.
19. Tchórzewski H. *Zapalenie – początek czy koniec choroby?* Alergia Astma Immunologia 1996; 1: 29-34.
20. Kim SC, Kim IK, Seo KK, et al. *Involvement of superoxide radical in the impaired endothelium-dependent relaxation of cavernous smooth muscle in hypercholesterolemic rabbits.* Urol Res 1997, 25 (5): 341-6.
21. Lizard G, Gueldry S, Sordet O, et al. *Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production.* FASEB J. 1998, 12 (15): 1651-63.
22. Clemente C, Caruso MG, Berloco P, et al. *α-tocopherol and β-carotene serum levels in post-menopausal women treated with transdermal estradiol and oral medroxyprogesterone acetate.* Horm Metab Res 1996, 28: 558-61.
23. Napoli C, Ambrosio G, Scarpato N, et al *Decreased low-density lipoprotein oxidation after repeated selective apheresis in homozygous familial hypercholesterolemia.* Am Heart J 1997, 133 (5): 585-95.
24. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, et al. *Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia.* Circulation 1997, 95 (12): 2617-22.
25. Rabaud C, Maignan M, Amiel C, et al. *Denutrition et infection par le VIH.* Rev Med Interne 1996, 17 (12): 992-1002.
26. Picard S. *Lipoprotein glyco-oxidation.* Diabete Metab 1995, 21 (2): 89-94.

Adres do korespondencji

dr n. med. **Tomasz Stetkiewicz**
Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy
Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki
w Łodzi
ul. Rzgowska 281/289
93-338 Łodź
tel. + 48 42 271 15 07
faks +48 42 271 49 78
e-mail: kgcm@interia.pl