

# Niskodawkowa terapia hormonalna a generacja reaktywnych form tlenu przez neutrofile

## *Low dose hormonal therapy and reactive oxygen intermediates generation by neutrophils*

Tomasz Stetkiewicz<sup>1</sup>, Grzegorz Stachowiak<sup>1</sup>, Paweł Pawłowicz<sup>2</sup>, Grzegorz Surkont<sup>3</sup>, Tomasz Pertyński<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Klinika Terapii Płodności, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, kierownik Kliniki: prof. dr hab. Krzysztof Szaflik

<sup>3</sup>Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, I Katedra Ginekologii i Późnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jacek Suzin

Przeгляд Menopausalny 2007; 3: 123–127

### Streszczenie

Wybór niskiej dawki estrogenu prowadzi do częściowej redukcji ryzyka hormonoterapii pomenopauzalnej (HT), co podnosi zyski z jej stosowania. Wypowiedzi ekspertów na temat roli HT w prewencji pierwotnej chorób układu krążenia są kontrowersyjne, natomiast faktem jest, że antyoksydacyjne właściwości estrogenów odgrywają bardzo ważną rolę w ich protekcyjnym działaniu na ścianę naczyń.

**Cel:** Porównanie wpływu niskich i wyższych dawek estrogenów na generację reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej.

**Metodyka:** Do badania włączono 116 pacjentek w okresie pomenopauzalnym. Badaną grupę (grupa I) stanowiło 59 kobiet, u których włączono terapię niskodawkową zawierającą 1 mg estradiolu + NETA. Grupę porównawczą (grupa II) stanowiło 57 kobiet z HT o składzie – 2 mg estradiolu + NETA. Efekt antyoksydacyjny hormonoterapii zastępczej określano porównując generację reaktywnych form tlenu (ROI – *reactive oxygen intermediates*) przez neutrofile krwi obwodowej pacjentek, ocenianą na podstawie pomiaru chemiluminescencji (CL), przed rozpoczęciem hormonalnej terapii zastępczej oraz po 3 i 6 mies. stosowania tej terapii.

**Wyniki:** Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w generacji ROI w obu badanych grupach.

**Wniosek:** Niskodawkowa terapia hormonalna wykazuje taki sam efekt antyoksydacyjny, jak terapia oparta na wyższych dawkach estrogenów.

**Słowa kluczowe:** terapia hormonalna, niskie dawki, reaktywne formy tlenu

### Summary

Low dose HT is considered a standard in modern menopausal hormonal therapy. Lipid peroxidation, especially LDL cholesterol, is a well known effect of reactive oxygen intermediates (ROI) activity in organisms. Lipid peroxidation products have atherogenic activity, increasing ischaemic heart disease risk. Oestrogens used in HT have an antioxidative effect protecting the blood vessel wall.

**Aim of study:** Comparison of antioxidative effect of hormonal therapy in groups of women receiving different oestrogen doses.

**Material and methods:** The study group consists of 59 women receiving low dose HT containing 1 mg oestradiol + NETA. The control group includes 57 women with HT containing 2mg oestradiol + NETA. ROI generation was evaluated in 20 µl peripheral blood samples. Spontaneous ROI generation and generation after neutrophil activation with stimulators formyl-metionyl-leucylphenylalanine (fMLP), phorbol acetate (PMA) and zymosan was measured. Luminol was used as an enhancer of chemiluminescence. Chemiluminescence associated with oxidation burst was measured with Luminometr 1251 at stable temperature during a 30 minute period (15 readings). Measurements were performed before applying continuous oestrogen-progestin hormonal replacement therapy, after 3 and 6 months of this therapy.

**Results:** Evaluating HT influence on ROI generation in the mentioned groups, we found no statistically significant differences.

**Conclusion:** Hormonal therapy antioxidative effect does not depend on oestrogen dose.

**Key words:** hormonal therapy, low doses, reactive oxygen intermediates

Adres do korespondencji:

dr med. **Tomasz Stetkiewicz**, Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

## Wstęp

We współczesnej terapii hormonalnej (HT) okresu około- i pomenopauzalnego standardem stały się niskie dawki estrogenów i gestagenów. Coraz więcej uwagi poświęca się możliwości stosowania ultraniskich dawek. Niskodawkowa terapia hormonalna wykazuje taką samą skuteczność w znoszeniu objawów klimakterycznych, jak terapia z *klasycznymi* dawkami hormonów, przy czym powoduje mniej skutków ubocznych i ułatwia porozumienie z pacjentką (ang. *compliance*) [1]. Objawy niepożądane występują tylko u ok. 60% stosujących niskie dawki, podczas gdy częstość tych objawów u kobiety przyjmujących wyższe dawki sięga ok. 80% [2]. Plamienie lub krwawienie w czasie pierwszych 3 mies. ciągłej HT niskodawkowej zgłasza tylko ok. 15% pacjentek, a przy wyższych dawkach estrogenów objaw ten występuje u ponad połowy kobiet [3]. Bolesność piersi podczas stosowania HT pojawia się u ok. 35% kobiet przy wyższych dawkach, a tylko u poniżej 10% pacjentek stosujących terapię niskodawkową [4]. U 16% kobiet z HT opartej na wyższych dawkach estrogenów objawy uboczne prowadzą do zaprzestania leczenia, gdy tylko 9% kobiet przyjmujących terapię niskodawkową pragnie przerwać leczenie z powodu objawów niepożądanych [2].

Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w sprawie stosowania HT, terapię tę powinno się rozpoczynać w oparciu o małe dawki estrogenów i progestagenów. Zaleca się również daleko idącą indywidualizację drogi podania, dawki i rodzaju stosowanego HT [5]. Za niskie dawki estrogenów uznaje się 1 mg estradiolu stosowanego doustnie lub 25 µg estradiolu uwalnianego w ciągu doby z plastra przy postaci przezskórnej. Wybór niskiej dawki estrogeny prowadzi do częściowej redukcji ryzyka hormonoterapii pomenopauzalnej, co podnosi zyski z jej stosowania [1]. Po opublikowaniu badań HERS, WHI i *The Million Women Study* aktualnym problemem jest wpływ terapii hormonalnej na układ krążenia. Prewencja wtórna chorób serca i naczyń przestała być zalecanym wskazaniem do stosowania HT. Prewencja pierwotna chorób krążenia jest wskazaniem względnym, a wypowiedzi ekspertów na ten temat są podzielone. Badania obserwacyjne wykazują efekty HT zarówno w prewencji pierwotnej, jak i wtórnej chorób układu sercowo-naczyniowego, ale nie potwierdzają tego wszystkie randomizowane badania kliniczne. HERS i WHI nie wykazały korzystnych efektów HT w chorobie wieńcowej. Dawki hormonów użyte w tych badaniach były zbyt wysokie dla wieku pacjentek, w odróżnieniu od stosowanych w badaniach obserwacyjnych. Badanie prewencji wtórnej WHISP, wykorzystujące różne reżimy niskodawkowej HT, wykazało również zmniejszenie incydentów wieńcowych. Ponieważ wiele badań jest rozbieżnych w ocenie prewencji pierwotnej i wtórnej, konieczne są dalsze badania nad różnymi preparatami i dawkami [6]. Wzrost ryzyka udaru i żylnej

choroby zakrzepowo-zatorowej spowodowany HT jest prawdopodobnie także zależny od dawki i wieku rozpoczęcia terapii, lecz jest na to mniej dowodów. Podsumowując, dawka HT jest wartością krytyczną, a większa możliwość korzystnego efektu jest związana z rozpoczęciem HT wcześniej po menopauzie [6]. HT może zatem prowadzić do korzystnych efektów u kobiet z chorobami układu sercowo-naczyniowego, ale dawka rozpoczynająca musi być niska, odpowiednia do wieku danej kobiety [6]. W wyjaśnianiu prewencji pierwotnej terapii hormonalnej w stosunku do chorób układu krążenia coraz więcej uwagi poświęca się działaniu estrogenów na poziomie molekularnym. Korzystne działanie estrogenów na zdrową ścianę naczyń polega zarówno na zapobieganiu proliferacji komórek mięśnia gładkich [7], jak i zmniejszaniu adhezji monocytów i agregacji makrofagów [8]. Estrogeny powodują również uwalnianie ze ściany naczyń czynników wazoaktywnych, mających działanie naczyniorozszerzające [8].

W działaniu protekcyjnym na ścianę naczyń bardzo ważną rolę odgrywają antyoksydacyjne właściwości estrogenów. W patogenezie miażdżycy istotnym czynnikiem jest peroksydacja LDL zachodząca pod wpływem wolnych rodników [9]. Peroksydacja LDL prowadzi do akumulacji wolnego cholesterolu w makrofagach, proliferacji komórek mięśni gładkich w naczyniach, uszkodzeń struktury ściany naczyniowej. Procesy peroksydacji uszkadzają frakcję HDL, która traci swe zdolności do zwrotnego transportu cholesterolu. U osób z chorobą niedokrwienną serca stwierdzono podwyższoną zawartość markerów peroksydacji LDL oraz przeciwciał skierowanych przeciwko produktom tej peroksydacji [9]. W badaniach porównujących kobiety przed i po menopauzie stwierdzono u tych ostatnich podwyższone poziomy produktów peroksydacji lipidów w surowicy krwi [10]. Wiele badań, w tym badania własne [11], potwierdza antyoksydacyjne działanie estrogenów stosowanych w menopauzalnej HT. Działanie antyoksydacyjne estrogenów polega na zapobieganiu peroksydacji LDL, a w związku z tym na hamowaniu mechanizmów aterogennych opisanych powyżej [12]. Z drugiej strony, estrogeny działając antyoksydacyjnie zapobiegają bardzo szybkiej inaktywacji tlenku azotu (NO) przez reaktywne formy tlenu [13]. Znana jest protekcyjna rola tlenku azotu (NO) w stosunku do rozwoju miażdżycy. Ma zdolności naczyniorozszerzające, a ponadto hamuje procesy proliferacyjne w endotelium naczyń krwionośnych.

Mając na uwadze obowiązujące standardy terapii niskodawkowej, otwartą kwestią pozostaje, czy niższe dawki estrogenów są równie skuteczne w korzystnym dla ściany naczyń działaniu antyoksydacyjnym.

## Cel pracy

Celem pracy jest porównanie wpływu niskich i wyższych dawek estrogenów na generację reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej.

## Metodyka

Do badania włączono 116 pacjentek w okresie pomenopauzalnym. Były one pacjentkami Poradni Kliniki Ginekologii i Chorób Menopauzy ICZMP w Łodzi. Kryteriami wykluczającymi było istnienie przeciwwskazań do terapii hormonalnej, ostre lub przewlekłe choroby zapalne, cukrzyca, stosowanie leków o właściwościach antyoksydacyjnych i HT przez ostatnie 6 mies.

Pacjentki zakwalifikowano do hormonalnej terapii. Zastosowano HT doustną ciągłą, zawierającą 17 $\beta$ -estradiol i octan norethisteronu (NETA). Badaną grupę (grupa I) stanowili 59 kobiet (średnia wieku 54,1 $\pm$ 4,9), u których włączono terapię niskodawkową, zawierającą 1 mg estradiolu + NETA. Grupę porównawczą (grupa II) stanowiło 57 kobiet (średnia wieku 54,7 $\pm$ 4,2) z HT o składzie – 2 mg estradiolu + NETA.

Efekt antyoksydacyjny HT 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 neutrofile zastosowano stymulatory, takie jak formylo-metionilo-leucylofenyloalanina (fMLP), octan mirystynianu forbolu (PMA) i zymosan firmy Sigma-Aldrich. Jako wzmacniacza chemiluminescencji bezpośrednio użyto luminolu (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 temp. 37 $^{\circ}$ 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:

- pole powierzchni pod krzywą emisji w funkcji czasu liczoną w ciągu 30 min, wyrażające całkowitą ilość energii wyemitowaną przez komórki w czasie pomiaru,
- maksimum krzywej emisji.

Oceniano chemiluminescencję spontaniczną (BS) i stymulowaną fMLP, PMA i zymosanem neutrofile. Próbkę, w których oceniano wybuch tlenowy neutrofile spoczynkowych zawierały 20  $\mu$ l krwi pełnej, 20  $\mu$ l luminolu, 20  $\mu$ l PBS (BS), lub 20  $\mu$ l fMLP ( $2 \times 10^{-6}$  M/ml), lub 20  $\mu$ l PMA ( $2 \times 10^{-8}$  M/ml) lub 30  $\mu$ l zymosanu (10 mg/ml), PBS do łącznej objętości 1000  $\mu$ l.

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

## Wyniki

Wartości pól pod krzywymi emisji chemiluminescencji spontanicznej (BS) i po stymulacji fMLP, PMA

i zymosanem neutrofile spoczynkowych nie wykazywały różnic istotnych statystycznie w porównaniu grupy kobiet z niskodawkową terapią hormonalną zawierającą 1 mg estradiolu (grupa I) z kobietami otrzymującymi terapię opartą o dawkę 2 mg estradiolu (grupa II) – zarówno przed rozpoczęciem terapii, jak i w jej trakcie (tab. I).

Wartości maksymalne chemiluminescencji spontanicznej i po stymulacji fMLP, PMA i zymosanem neutrofile spoczynkowych również nie wykazywały takich różnic w obu badanych grupach pacjentek (tab. I).

## Dyskusja

W pracy dokonano oceny generacji reaktywnych form tlenu (ROI) przez neutrofile krwi obwodowej kobiet w wieku pomenopauzalnym, przed i w trakcie stosowania ciągłej, złożonej terapii hormonalnej. Generacja ROI zmniejsza się w sposób istotny statystycznie już po 3 mies. stosowania HT, co potwierdza jej działanie antyoksydacyjne. W prezentowanych badaniach efekt antyoksydacyjny terapii hormonalnej nie był zależny od zastosowanej dawki estrogenów.

Wiele badań, w tym badania własne [11, 14–16], potwierdza antyoksydacyjne działanie estrogenów stosowanych w menopauzalnej HT. Nadal jednak molekularny mechanizm tego działania pozostaje nie do końca wyjaśniony [11]. Ponadto niewiele jest badań z zastosowaniem różnych rodzajów estrogenów lub oceniających efekt antyoksydacyjny HT w zależności od zastosowanej dawki.

Lacort i wsp. w układzie *in vitro* przy wykorzystaniu zjawiska peroksydacji fosfolipidów w błonach mikrosomów pochodzących z wątroby przy zastosowaniu czterech systemów indukcji peroksydacji lipidów: Fe<sup>3+</sup>/ADP/NADPH, Fe<sup>2+</sup>/askorbinian, nadlenek tert-butyloowy, 2,2'-azobis (2-amidynopropan) porównywali efekt antyoksydacyjny wielu estrogenów – estronu, estriolu, 17 $\beta$ -estradiolu, 17 $\alpha$ -etyloestradiolu, mestranolu, dietylostilbestrolu oraz katecholestenogenów. Wszystkie estrogeny użyte były tylko w jednej dawce [17].

Arteaga i wsp. [18], postulując antyoksydacyjne właściwości estrogenów jako wyjaśnienie kardioprotekcyjnego działania hormonalnej terapii zastępczej, badali wpływ estradiolu na oksydację lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). 10 próbek LDL izolowanych z krwi nieleczonych hormonami kobiet postmenopauzalnych, było inkubowanych przez 4 godz. z siarczanem miedzi wywołującym oksydację w obecności estradiolu w stężeniach 0–26  $\mu$ g/ml. Stwierdzono, że estradiol powodował zależne od dawki zmniejszenie generacji markera peroksydacji LDL – dialdehydu malonowego (MDA) – z 61,8 $\pm$ 30,2 nmol/mg do 11,6 $\pm$ 7,1 nmol/mg przy najwyższym stężeniu estradiolu.

Według Liehra i Roya [19] bardzo istotne są stężenia estrogenów w badanych tkankach. Poziomy estrogenów wyższe od fizjologicznych mogą powodować, że genera-

**Tab. I.** Parametry chemiluminescencji spontanicznej (BS) i po stymulacji neutrofilii spoczynkowych w zależności od dawki estrogenu i czasu stosowania HT

Parametry chemiluminescencji		Parametry statystyczne	Okres stosowania HT			
			0	3 mies.	6 mies.	
pole pod krzywą	BS (mVxmin)	grupa I (n=59)	średnia ±SD	1518,6±895,6	829,5±479,4	540,9±229,7
			min.±maks.	558,2±3434,0	322,3±2010,6	177,9±1016,5
	grupa II (n=57)	średnia ±SD	1930,2±999,9	845,6±401,2	640,6±282,8	
		min.±maks.	515,1±3810,9	316,3±1900,5	274,6±1553,4	
	fMLP (mVxmin)	grupa I (n=59)	średnia ±SD	4344,6±2396,6	2812,8±1385,0	1854,3±578,9
			min.±maks.	1789,5±10874,4	1459,6±5321,1	836,1±3028,6
	grupa II (n=57)	średnia ±SD	4714,2±1819,3	2717,5±1017,3	2061,5±772,2	
		min.±maks.	1901,8±7961,6	1122,9±5160,0	728,5±3877,5	
	PMA (mVxmin)	grupa I (n=59)	średnia ±SD	4324,9±2745,4	2208,3±1594,0	1305,5±659,9
			min.±maks.	1688,5±11984,9	638,5±6542,3	550,9±2836,6
	grupa II (n=57)	średnia ±SD	4458,1±3122,3	1754,5±1118,3	1179,2±438,9	
		min.±maks.	1010,3±14679,3	669,9±5280,5	464,1±2134,7	
Z (mVxmin)	grupa I (n=59)	średnia ±SD	14835,4±9372,6	7918,3±5344,3	6457,7±3120,0	
		min.±maks.	5354,7±37416,6	2491,7±18890,8	1844,0±12727,2	
grupa II (n=57)	średnia ±SD	19307,8±11714,2	10655,9±5689,0	7912,4±4546,3		
	min.±maks.	5794,9±59049,4	3265,9±23756,0	2380,0±18927,8		
wartość maksymalna	BS (mV)	grupa I (n=59)	średnia ±SD	69,9±38,3	38,6±19,7	24,2±11,9
			min.±maks.	22,7±150,2	15,9±85,8	7,3±57,8
	grupa II (n=57)	średnia ±SD	87,3±48,3	37,2±19,6	30,2±18,0	
		min.±maks.	21,9±203,3	12,2±108,6	11,6±105,0	
	fMLP (mV)	grupa I (n=59)	średnia ±SD	212,5±127,1	135,5±69,0	92,0±36,3
			min.±maks.	81,5±597,6	57,3±339,8	37,2±159,4
	grupa II (n=57)	średnia ±SD	212,8±90,8	123,0±51,1	91,7±40,3	
		min.±maks.	75,6±508,3	46,7±245,2	41,7±220,4	
	PMA (mV)	grupa I (n=59)	średnia ±SD	308,7±185,9	135,1±109,3	82,0±52,9
			min.±maks.	89,7±651,9	30,3±452,0	27,9±237,2
	grupa II (n=57)	średnia ±SD	264,6±202,0	117,0±89,4	73,2±33,1	
		min.±maks.	59,3±930,3	36,8±408,1	25,5±136,8	
Z (mV)	grupa I (n=59)	średnia ±SD	844,4±467,7	484,9±297,6	415,4±179,6	
		min.±maks.	344,1±2088,1	178,2±1233,2	115,7±757,4	
grupa II (n=57)	średnia ±SD	1003,6±540,0	694,0±356,3	482,9±287,7		
	min.±maks.	313,1±2640,4	289,1±1768,6	130,8±1251,7		

cja wolnych rodników przez estrogeny dominuje nad ich właściwościami antyoksydacyjnymi.

Z kolei Olinescu i wsp. [20], badając wpływ estronu na generację wolnych rodników przez ludzkie neutrofile przy wykorzystaniu chemiluminescencji stwierdzili, że przy stężeniach mniejszych od  $10^{-5}$  moli/l estron zwiększa generację wolnych rodników, a przy stężeniach większych hamował ją. Działa się tak w układach komórkowych. W układach pozbawionych komórek zależność była odwrotna.

W badaniach innych autorów poświęconych ocenie antyoksydacyjnego działania estrogenów jedynie w doświadczeniach *in vitro* podejmowane są próby oceny korelacji pomiędzy zastosowanym stężeniem hormonów a wielkością efektu antyoksydacyjnego. Zastanawia brak takich analiz w przytaczanych wcześniej badaniach *in vivo*. W dostępnej literaturze próbę oceny tej zależności podjęli jedynie Clemente i wsp. [21] Analogicznie do wyników niniejszej pracy, nie wykazali oni statystycznie istotnej korelacji między peroksydacją lipidów mierzoną przy pomocy MDA a wielkością zastosowanej dawki estrogenów.

## Wniosek

Niskodawkowa terapia hormonalna wykazuje taki sam efekt antyoksydacyjny, jak terapia oparta na wyższych dawkach estrogenów.

## Piśmiennictwo

- Gambacciani M, Genazzani AR. From the challenge to the reassessment of the Women's Health Initiative: a personal initiative for women's health. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22: 115-6.
- Notelovitz M, Lenihan JP, McDermott M, et al. Initial 17beta-estradiol dose for treating vasomotor symptoms. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 726-31.
- Johnson JV, Davidson M, Archer D, Bachmann G. Postmenopausal uterine bleeding profiles with two forms of continuous combined hormone replacement therapy. *Menopause* 2002; 9: 16-22.
- Stadberg E, Mattsson LA, Uvebrant M. 17 beta-estradiol and norethisterone acetate in low doses as continuous combined hormone replacement therapy. *Maturitas* 1996; 23: 31-9.
- Rekomendacje PTG w sprawie stosowania HRT po badaniach WHI i Million Women Study. *Prz Menopauz* 2003; 5: 8-9.
- Stevenson JC. Hormone replacement therapy: review, update, and remaining questions after the Women's Health Initiative Study. *Curr Osteoporosis Rep* 2004; 2: 12-6.
- Pare G, Krust A, Karas RH, et al. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 2002; 90: 1087-92.
- Mikkola TS, St Clair RW. Estradiol reduces basal and cytokine induced monocyte adhesion to endothelial cells. *Maturitas* 2002; 41: 313-9.
- Holvoet P, Collen D. Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 137 Suppl: S33-38.
- Bednarek-Tupikowska G, Tupikowski K, Bidzinska B, et al. The effect of estrogen deficiency, estrogen and estrogen-progestagens therapy on total plasma homocysteine and serum lipid peroxide levels in postmenopausal women. *Ginekolog* 2005; 76: 687-92.
- Stetkiewicz T, Połać I, Stachowiak G, et al. Assessment of the influence of hormonal replacement therapy in postmenopausal women on reactive oxygen intermediates generation by neutrophils. *Acta Toxicologica* 2003; 11: 75-78.
- Walsh BA, Mullick AE, Banka CE, Rutledge JC. 17beta-estradiol acts separately on the LDL particle and artery wall to reduce LDL accumulation. *J Lipid Res* 2000; 1: 134-41.
- Schachinger V. Therapeutische Optionen zur Verbesserung der Myokardperfusion bei koronarer Atherosklerose Herz 1998; 23: 116-129.
- Yu X, Tang Y, Li F, et al. Protection against hydrogen peroxide-induced cell death in cultured human retinal pigment epithelial cells by 17beta-estradiol: a differential gene expression profile. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 1135-45.
- Moorthy K, Sharma D, Basir SF, Baquer NZ. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzymes and aminotransferases in naturally menopausal rats. *Exp Gerontol* 2005; 40: 295-302.
- Claassen H, Schunke M, Kurz B. Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage. *Cell Tissue Res* 2005; 319: 439-45.
- Lacort M, Leal AM, Liza M, et al. Protective effect of estrogens and catecholestrogens against peroxidative membrane damage *in vitro*. *Lipids* 1995; 30: 141-6.
- Arteaga E, Villaseca E, Rojas A, et al. Comparison of the antioxidant effect of estradiol and estradiol on low density lipoproteins in post-menopausal women. *Rev Med Chil* 1998; 126: 481-7.
- Liehr JG, Roy D. Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Rad Biol Med* 1990; 8: 415-23.
- Olinescu R, Hertoghe J, Săvoiu, et al. Steroid hormones may modulate the chemiluminescence emission produced by polymorphonuclear leukocytes. *Rom J Intern Med* 1994; 32: 37-46.
- Clemente C, Caruso MG, Berloco P, et al. Antioxidant effect of short-term hormonal treatment in postmenopausal women. *Maturitas* 1999; 31: 137-42.