

Porównanie działania terapii estrogenowej i hormonoterapii złożonej na wybrane funkcje neutrofili krwi obwodowej

Comparison of oestrogen and complex hormonal therapy impact on selected functions of neutrophils in peripheral blood

Tomasz Stetkiewicz¹, Grzegorz Stachowiak¹, Ireneusz Połać¹, Grzegorz Surkont², Tomasz Pertyński¹

¹Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi;

kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

²Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, I Katedra Ginekologii i Położnictwa, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;

kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jacek Suzin

Przeгляд Menopauzalny 2007; 4: 208–211

Streszczenie

Wiele badań, w tym badania własne, potwierdza antyoksydacyjne działanie estrogenów stosowanych w hormonoterapii menopauzalnej (HT). Molekularny mechanizm tego działania nie jest do końca wyjaśniony, a samo zagadnienie nadal kontrowersyjne. Otwartą kwestią jest również to, czy składowa progestagenna terapii hormonalnej ma wpływ na antyoksydacyjny efekt komponentu estrogenowego.

Cel pracy: Porównanie wpływu hormonalnej terapii estrogenowej i złożonej estrogenowo-gestagenowej, stosowanych u kobiet pomenopauzalnych na generację reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej.

Materiał i metody: Do badania włączono 88 kobiet w wieku pomenopauzalnym. W grupie I (42 pacjentki poddane wcześniej operacji usunięcia macicy) zastosowano doustną terapię hormonalną zawierającą 17 β -estradiol w dawce 1 mg. W grupie II (46 pacjentek) zastosowano HT doustną złożoną, o reżimie ciągłym, opartą na 1 mg 17 β -estradiolu i 0,5 mg octanu noretisteronu (NETA). Efekt antyoksydacyjny HT w obu grupach kobiet oceniano, porównując generację reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej pacjentek, oznaczaną na podstawie pomiaru chemiluminescencji przed rozpoczęciem terapii hormonalnej oraz po 3 i 6 mies. jej stosowania.

Wyniki: Wartości pól pod krzywymi i wartości maksymalne emisji chemiluminescencji spontanicznej neutrofili spoczynkowych oraz po stymulacji nie wykazywały różnic istotnych statystycznie w porównaniach obu grup kobiet.

Wniosek: Progestageny stosowane w złożonej terapii hormonalnej u kobiet pomenopauzalnych nie zmniejszają antyoksydacyjnego działania estrogenów.

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu, progestageny, estrogeny

Summary

Many studies confirm the anti-oxidative effect of oestrogens used in menopausal HT. But it is still a controversial issue and its molecular mechanism is still not well known. There is also still the question whether the progestin component of hormonal therapy has an influence on the oxidative effect of the oestrogen component.

Aim of study: Comparison of oestrogen only and complex hormonal therapy effect in postmenopausal women on generation of reactive oxygen species by neutrophils in peripheral blood.

Material and methods: 88 postmenopausal women were included in the study. In group I of women (42 patients) after hysterectomy oral hormonal therapy containing 1 mg of 17 β -oestradiol was applied. In group II (46 patients) oral complex continuous HT based on 1 mg 17 β -oestradiol and 0.5 mg noretisterone acetate (NETA) was used. Anti-oxidative effect of HT in both groups was evaluated by comparison of reactive oxygen species generation by neutrophils of peripheral blood using chemiluminescence measurement. Measurements were obtained before HT application and after 3 and 6 months of this treatment.

Adres do korespondencji:

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

Results: Areas under curves and maximal energy values of spontaneous chemiluminescence and stimulated neutrophils show no differences between groups.

Conclusion: Progestins used in complex therapy in postmenopausal women do not decrease the anti-oxidative effect of oestrogens.

Key words: reactive oxygen species, progestins, oestrogens

Wstęp

Progestageny są związkami chemicznymi o budowie steroidowej, charakteryzującymi się powinowactwem do receptora progesteronowego. Związki te znalazły na przestrzeni lat szerokie zastosowanie w ginekologii i położnictwie. U kobiet w okresie klimakterium progestageny są obecnie stosowane w terapii zaburzeń miesiączkowania, rozrostów endometrium, endometriozy, łagodnych zmian sutka oraz niektórych nowotworów (rak trzonu macicy, jajnika, sutka). Jeśli zachodzi taka potrzeba, i nie ma przeciwwskazań, są również skutecznym środkiem antykoncepcyjnym (tabletki, iniekcje domięśniowe, implanty podskórne). W ramach terapii hormonalnej u kobiet w wieku okołomenopauzalnym i pomenopauzalnym ich główną – choć nie jedyną – rolę jest zabezpieczenie błony śluzowej jamy macicy przed rozrostami, a w konsekwencji przed rozwojem *adenocarcinoma endometrii*.

Zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczącymi terapii hormonalnej (HT) do zapewnienia bezpieczeństwa i *compliance* HT istotny jest zindywidualizowany, właściwy dobór komponentu progestagenowego – możliwie w niskiej dawce [1]. Z każdym rokiem poszerza się grupa związków progestagenowych dostępnych w terapii ginekologicznej. Zjawisko takie obserwowane jest również na polu terapii hormonalnej. Do znalezienia idealnego progestagenu ciągle jest jednak daleko. Jedną z cech takiego idealnego progestagenu jest jak najmniejsze działanie znoszące korzystne efekty komponentu estrogenowego. U podstaw korzystnego działania estrogenów – zarówno wobec krótkotrwałych, jak i odległych skutków menopauzy – leży ich efekt antyoksydacyjny. Wiele badań, w tym badania własne [2–5], potwierdza antyoksydacyjne działanie estrogenów stosowanych w menopauzalnej HT. Jego mechanizm molekularny nadal pozostaje do końca niewyjaśniony, a samo zagadnienie wciąż budzi kontrowersje [5]. Otwartą kwestią jest również to, czy składowa progestagenowa terapia hormonalnej ma wpływ na antyoksydacyjny efekt komponentu estrogenowego.

Cel pracy

Porównanie wpływu hormonalnej terapii estrogenowej i złożonej estrogenowo-gestagenowej, stosowanych u kobiet pomenopauzalnych na generację reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej.

Materiał i metody

Do badania włączono 88 kobiet w wieku pomenopauzalnym, leczonych w Poradni Kliniki Ginekologii i Chorób Menopauzy ICZMP w Łodzi. Badane kobiety ze wskazaniami do stosowania terapii hormonalnej i po wykluczeniu ewentualnych przeciwwskazań zakwalifikowano do HT. Dodatkowymi kryteriami wykluczającymi były występowanie ostrych lub przewlekłych chorób zapalnych, cukrzycy, stosowanie leków o właściwościach antyoksydacyjnych oraz HT w okresie ostatnich 6 mies. Grupę I (n=42) stanowiły chore, które w wywiadzie zgłosiły, że wcześniej poddane były operacji usunięcia macicy. W grupie tej zastosowano doustną terapię hormonalną zawierającą 17 β -estradiol w dawce 1 mg. Pacjentkom z grupy II (n=46) podawano HT doustną złożoną, o reżimie ciągłym, opartą na 1 mg 17 β -estradiolu i 0,5 mg octanu noretisteronu (NETA).

Efekt antyoksydacyjny HT w obu grupach kobiet oceniano, porównując generację reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej pacjentek, oznaczaną na podstawie pomiaru chemiluminescencji (CL) w czasie tzw. wybuchu tlenowego tych komórek przed rozpoczęciem terapii hormonalnej oraz po 3 i 6 mies. jej stosowania. Do wywołania wybuchu tlenowego neutrofilii zastosowano stymulatory – formylo-metionilo-leucylofenyloalaninę (fMPLP), octan mirystynianu forbolu (PMA) i zymosan firmy Sigma-Aldrich. Jako wzmacniacza chemiluminescencji bezpośrednio użyto luminolu (Sigma-Aldrich). Płyn PBS (fizjologiczny roztwór NaCl zbuforowany fosforanami) wyprodukowała firma 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 wykonywał 15 pomiarów. Każdą serię pomiarów przeprowadzano 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 wartość energii wyemitowaną przez komórki w czasie pomiaru,
- maksimum krzywej emisji.

Oceniano chemiluminescencję spontaniczną neutrofilii (BS) i stymulowaną za pomocą fMPLP, PMA oraz zymosanu. Próbkę, w których oceniano wybuch tlenowy neutrofilii spoczynkowych zawierały 20 μ l krwi pełnej, 20 μ l luminolu, 20 μ l PBS (BS), lub 20 μ l fMPLP (2×10^{-6} M/ml), lub 20 μ l PMA (2×10^{-8} M/ml), lub 30 μ l zymosan (10 mg/ml), PBS do łącznej objętości 1000 μ l.

Do oceny istotności zmian wartości parametrów chemiluminescencji w czasie stosowania HT w obu grupach pacjentek użyto metody analizy wariancji dla zmiennych zależnych.

Wyniki

Wartości pól pod krzywymi emisji chemiluminescencji spontanicznej (BS) neutrofilii spoczynkowych i po stymulacji fMLP, PMA oraz zymosanem nie wykazywały

różnic istotnych statystycznie w porównaniu grupy kobiet stosujących estrogenową terapię hormonalną zawierającą 1 mg estradiolu (grupa I) z chorymi otrzymującymi terapię opartą o 1 mg estradiolu + 0,5 mg NETA (grupa II) – zarówno przed rozpoczęciem terapii substytucyjnej, jak i w jej trakcie (tab. I).

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

Tab. I. Parametry chemiluminescencji spontanicznej (BS) neutrofilii spoczynkowych i wywołanej stymulacją w zależności od rodzaju terapii oraz czasu stosowania HT

Parametry chemiluminescencji	Parametry statystyczne	Czas stosowania HT			
		0	3 mies.	6 mies.	
pole pod krzywą	BS (mVxmin.)	grupa I (n=42)	średnia±SD min.÷maks. 1556,5±910,7 558,2±3434,0	856,7±481,4 322,3±2010,6	537,0±236,7 177,9±1016,5
		grupa II (n=46)	średnia±SD min.÷maks. 1896,3±1000,0 515,1±3810,9	830,6±402,7 316,3±1900,5	639,3±278,0 274,6±1553,4
	fMLP (mVxmin.)	grupa I (n=42)	średnia±SD min.÷maks. 4436,8±2443,9 1789,5±10874,4	2883,8±1398,2 1459,6±5321,1	1846,1±596,9 836,1±3028,6
		grupa II (n=46)	średnia±SD min.÷maks. 4652,8±1819,0 1901,8±7961,6	2682,8±1017,5 1122,9±5160,0	2058,9±758,9 728,5±3877,5
	PMA (mVxmin.)	grupa I (n=42)	średnia±SD min.÷max 4380,2±2825,7 1688,5±11984,9	2306,4±1592,4 771,9±6542,3	1310,5±681,2 550,9±2836,6
		grupa II (n=46)	średnia±SD min.÷max 4424,2±3073,6 1010,3±14679,3	1717,3±1117,6 638,5±5280,5	1180,7±431,4 464,1±2134,7
Zb (mVxmin.)	grupa I (n=42)	średnia±SD min.÷max 14922,0±9673,0 5354,7±37416,6	8077,6±5477,8 2491,7±18890,8	6400,3±3213,1 1844,0±12727,2	
	grupa II (n=46)	średnia±SD min.÷max 19112,5±11560,0 5794,9±59049,4	10479,7±5672,8 3265,9±23756,0	7894,5±4468,3 2380,0±18927,8	
wartość maksymalna	BS (mV)	grupa I (n=42)	średnia±SD min.÷max 71,6±38,9 22,7±150,2	39,9±19,5 15,9±85,8	23,9±12,2 7,3±57,8
		grupa II (n=46)	średnia±SD min.÷max 85,8±48,2 21,9±203,3	36,6±19,6 12,2±108,6	30,1±17,7 11,6±105,0
	fMLP (mV)	grupa I (n=42)	średnia±SD min.÷maks. 216,6±130,1 81,5±597,6	137,8±70,6 57,3±339,8	92,0±37,5 37,2±159,4
		grupa II (n=46)	średnia±SD min.÷maks. 210,6±90,0 75,6±508,3	122,2±50,4 46,7±245,2	91,7±39,6 41,7±220,4
	PMA (mV)	grupa I (n=42)	średnia±SD min.÷maks. 298,6±187,1 89,7±651,9	141,6±109,4 46,2±452,0	82,3±54,6 27,9±237,2
		grupa II (n=46)	średnia±SD min.÷maks. 271,5±202,1 59,3±930,3	114,2±89,2 30,3±408,1	73,3±32,5 25,5±136,8
	Z (mV)	grupa I (n=42)	średnia±SD min.÷maks. 853,5±481,5 344,1±2088,1	490,3±306,6 178,2±1233,2	412,8±185,2 115,7±757,4
		grupa II (n=46)	średnia±SD min.÷maks. 993,4±533,5 313,1±2640,4	684,2±354,3 289,1±1768,6	482,1±282,7 130,8±1251,7

Dyskusja

Badaniach wykazały, że komponent progestagenowy złożonej terapii hormonalnej nie zmniejsza korzystnego efektu antyoksydacyjnego estrogenów. Większość przeprowadzonych badań dotyczy antyoksydacyjnego efektu estrogenów. Niewiele jest dostępnych prac oceniających działanie antyoksydacyjne gestagenów, a ich wyniki są rozbieżne.

Według Arteagi i wsp. [6] gestageny nie przejawiają ani działania antyoksydacyjnego, ani prooksydacyjnego. Co więcej, ich działanie nie zaburza antyoksydacyjnego efektu estrogenów w przypadku ich jednoczesnego stosowania w HT.

Takie same wnioski wyciągnięte zostały na podstawie wyników innych badań prowadzonych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [7, 8].

Przeciwnie, Goodman i wsp. [9] udowodnili aktywność antyoksydacyjną gestagenów w badaniach *in vitro* nad peroksydacją LDL wywołowaną FeSO_4 i β -peptydem amyloidowym.

Aktywność tą potwierdzili w swoich badaniach *in vivo* Tanquilli, Mazzanti i Cugini [10]. Wykazali oni w grupie 12 kobiet okołomenopauzalnych hamujący wpływ octanu medroksyprogesteronu podawanego przez 5 dni w dawce 20 mg/dzień na peroksydację LDL w błonach płytek krwi ocenianą za pomocą skoniugowanych dienów. Co więcej, w II etapie badań udowodniono, że przy stosowaniu HT estrogenowo-gestagenowej peroksydacja LDL była niższa w fazie cyklu, gdy kobiety otrzymywały plastry uwalniające 50 μg estradiolu i 10 mg octanu medroksyprogesteronu niż w fazie gdy podawany był sam estrogen.

Z kolei Clemente i wsp. [11] stwierdzili, że gestageny zmniejszają w niewielkim stopniu efekt antyoksydacyjny estrogenów w przypadku ich łącznego stosowania w HT.

W badaniach Bednarek-Tupikowskiej i wsp. porównywano wpływ terapii estrogenowej i estrogenowo-gestagenowej na peroksydację lipidów oraz całkowity status antyoksydacyjny organizmu (ang. *total antioxidative status* – TAS). Stwierdzono, że komponent progestagenowy, w tym przypadku octan medroksyprogesteronu (MPA), nie zmniejsza pozytywnego działania antyoksydacyjnego estrogenów [12].

Wnioski

Progestageny stosowane w złożonej terapii hormonalnej u kobiet pomenopauzalnych nie zmniejszają antyoksydacyjnego działania estrogenów.

Piśmiennictwo

1. Rekomendacja Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w sprawie stosowania hormonalnej terapii zastępczej po badaniach WHI i *Million Women Study*. Prz Menopauz 2003; 5: 8-9.

2. Yu X, Tang Y, Li F, et al. Protection against hydrogen peroxide-induced cell death in cultured human retinal pigment epithelial cells by 17 β -estradiol: a differential gene expression profile. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 1135-45.
3. Moorthy K, Sharma D, Basir SF, Baquer NZ. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats. *Exp Gerontol* 2005; 40: 295-302.
4. Claassen H, Schunke M, Kurz B. Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage. *Cell Tissue Res* 2005; 319: 439-45.
5. 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: 75-8.
6. Arteaga E, Villaseca P, Rojas A, et al. Comparison of the antioxidant effect of estril and estradiol on low density lipoproteins in post-menopausal women. *Rev Med Chil* 1998; 126: 481-7.
7. McManus J, McEneny J, Young IS, Thompson W. The effect of various oestrogens and progestogens on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation *in vitro*. *Maturitas* 1996; 25: 125-31.
8. Schröder J, Dören M, Schneider B, Oettel M. Are the antioxidative effects of 17 β -estradiol modified by concomitant administration of a progestin? *Maturitas* 1996; 25: 133-9.
9. Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1996; 66: 1836-44.
10. Tranquilli AL, Mazzanti L, Cugini M. Transdermal estradiol and medroxyprogesterone acetate in hormone replacement therapy are both antioxidants. *Gynecol Endocrinol* 1995; 9: 137-41.
11. Clemente C, Caruso MG, Berloco P, et al. Antioxidant effect of short-term hormonal treatment in postmenopausal women. *Maturitas* 1999; 31: 137-42.
12. Bednarek-Tupikowska G, Tupikowski K, Bidzinska B, et al. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol* 2004; 19: 57-63.