

# Długość stosowania hormonalnej terapii zastępczej a jej efekt antyoksydacyjny

## *Hormonal replacement therapy duration and its antioxidative effect*

Tomasz Stetkiewicz, Sławomir Jędrzejczyk, Ireneusz Połać, Grzegorz Stachowiak, Andrzej Pakalski, Tomasz Pertyński

*Niektóre efekty HRT mogą być związane z antyoksydacyjnym działaniem estrogenów, które chronią struktury komórki przed zniszczeniem poprzez wpływ na zmniejszenie produkcji wolnych rodników. Celem pracy była ocena efektu antyoksydacyjnego hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) u kobiet w okresie pomenopauzalnym w zależności od czasu jej stosowania. Badaną grupę stanowiło 46 kobiet w okresie pomenopauzalnym. Generację reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej oceniano metodą chemiluminescencji. Oznaczeń dokonywano przed rozpoczęciem ciągłej estrogenowo-gestagenowej hormonalnej terapii zastępczej, po 3 i po 6 mies. stosowania tej terapii. Wykazano, że im dłuższy jest czas stosowania HTZ, tym generacja reaktywnych form tlenu jest mniejsza.*

*Słowa kluczowe: hormonalna terapia zastępcza, reaktywne formy tlenu*

*(Przegląd Menopauzalny 2003; 4:65–69)*

Estrogeny stosowane w hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) wykazują działanie antyoksydacyjne, zmniejszając szkodliwe działanie reaktywnych form tlenu (RFT) u kobiet w okresie około- i pomenopauzalnym. RFT są odpowiedzialne za depolimeryzację polisacharydów i zmiany konformacji białek przez utlenianie grup tiolowych [1]. Powodują rozrywanie wiązań dwusiarczkowych w białkach, co prowadzi do ich denaturacji, a co za tym idzie – do zmian w aktywności enzymów, m.in. cyklazy adenylowej i fosfodiesterazy, które przez udział w regulacji cyklicznego cAMP wpływają na podziały komórkowe. Istotna jest także inaktywacja dehydrogenaz NADPH w łańcuchu oddechowym. RFT powodują peroksydację lipidów błon komórkowych, a w związku z tym ich degradację i zmianę aktywności receptorów. Wolne rodniki reagują z zasadami purynowymi i pirymidynowymi, powo-

dując uszkodzenia DNA [1]. Zmiany oksydoredukcyjne jonów metali, zachodzące pod ich wpływem prowadzą do zaburzeń układów enzymatycznych, w których te metale są kofaktorami [1].

RFT prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w patogenezie wielu schorzeń: miażdżycy, chorób reumatycznych, chorób ośrodkowego układu nerwowego (choroba Alzheimera), chorób nowotworowych, zespołu niewydolności oddychania dorosłych, uszkodzeń mięśnia sercowego w czasie zawału/reperfuzji, przewlekłych chorób płuc i nerek, poalkoholowych zmian w wątrobie, mikroangiopatii w cukrzycy [1–4].

Został udowodniony hamujący wpływ estrogenów na zjawisko oksydacyjnej modyfikacji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), który to proces prowadzi do wzrostu ich aterogenności i zwiększenia ryzyka chrób układu krążenia [5–7].

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



Działanie antyoksydacyjne estrogenów w stosunku do lipoprotein dotyczy także i ochronnego działania tych hormonów w stosunku do struktur błonowych [5, 8].

Wykazano, że do naczyniorozszerzającego działania estrogenów stosowanych w terapii zastępczej dochodzi za pośrednictwem ich efektu antyoksydacyjnego.

Ekspozycja endotelium na estrogeny poprzez hamowanie generacji anionu nadtlenkowego powoduje wzrost uwalniania NO przez endotelium, a zatem efekt naczyniorozszerzający [9].

Uważa się, że szybsza progresja przewlekłych chorób nerek u mężczyzn jest uzasadniana protekcyjnym antyoksydacyjnym działaniem estrogenów u kobiet [3].

Estrogeny wykazują również protekcyjny wpływ w mięśniu sercowym, zmniejszając uszkodzenia komórek spowodowane przez wolne rodniki w czasie niedokrwienia/reperfuzji, co przejawia się zmniejszoną generacją dialdehydu malonowego (MDA) – produktu peroksydacji lipoprotein i mniejszym spadkiem zawartości glutationu [10].

Keller i wsp. [2] potwierdzili w swoich badaniach hipotezę, że estrogeny stosowane w HTZ u pacjentek z chorobą Alzheimera działają bezpośrednio na synapsy, znosząc w nich oksydacyjne upośledzenie transportu przezbłonowego.

Antyoksydacyjne działanie estrogenów w chorobie Alzheimera potwierdzili również w swoich badaniach Behl i wsp. [11]. Wykazali oni, że 17-beta-estradiol i jego pochodne mogą przeciwdziałać gromadzeniu się nadtlenków w przestrzeni międzykomórkowej, a w związku z tym degradacji neuronów początkowych i klonalnych komórek hipokampa.

Działanie antyoksydacyjne estrogenów jest postulowane nie tylko w chorobie Alzheimera, ale też w ostrych stanach dotyczących OUN. Badano warunki podobne do stresu oksydacyjnego w wylewie, urazie i niedokrwieniu tkanki nerwowej, wykazując wpływ estrogenów na zmniejszenie ubytków tkanki ekspozowanej na prooksydacyjne działanie hemoglobiny i oksydazy cytochromowej [12].

## Cel pracy

Ocena efektu antyoksydacyjnego hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) u kobiet w okresie pomenopauzalnym, w zależności od czasu jej stosowania.

## Materiał i metody

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. 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 Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

Pacjentki zakwalifikowano do ciągłej estrogenowo-gestagenowej hormonalnej terapii zastępczej.

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). 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  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ . 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 neutrofilii. Próbkę, w których oceniano wybuch tlenowy neutrofilii spoczynkowych zawierały 20  $\mu\text{l}$  krwi pełnej, 20  $\mu\text{l}$  luminolu, 20  $\mu\text{l}$  PBS (BS), lub 20  $\mu\text{l}$  fMLP ( $2 \times 10^{-6}$  M/ml), lub 20  $\mu\text{l}$  PMA ( $2 \times 10^{-8}$  M/ml) lub 30  $\mu\text{l}$  zymosan (10 mg/ml), PBS do łącznej objętości 1 000  $\mu\text{l}$ . Do oceny istotności zmian wartości parametrów chemiluminescencji w czasie stosowania HTZ w zależności od rodzaju terapii zastosowano metody analizy wariacji dla zmiennych zależnych.

## Wyniki

W tab. I przedstawiono wyniki analizy wpływu czasu stosowania HTZ na wartości parametrów chemiluminescencji. Zaobserwowano, że po 6 mies. stosowania terapii wartości zarówno pól pod krzywymi CL, jak i wartości maksymalne krzywych CL uległy statystycznie istotnemu zmniejszeniu, w porównaniu do odpowiadających im wartości po 3 mies. tej terapii ( $p < 0,0005$ ). Takie zmiany dotyczyły parametrów CL



**Tab. I.** Wpływ czasu stosowania HTZ na wartości parametrów chemiluminescencji

Parametry chemiluminescencji (pola pod krzywą)	Parametry statystyczne	Okres stosowania HTZ			Rezultaty analizy wariancji* p
		0	3 mies.	6 mies.	
BS (mVxmin) (n = 46)	średnia ±SD min.+max	1 778,1±9 73,5 515,1÷3 810,9	839,7±426,5 316,3÷2 010,6	603,7±266,3 177,9÷1 553,4	<0,0005
fMLP (mVxmin) (n = 46)	średnia ±SD min.+max	4 577,6±2 033,2 1 789,5÷10 874,4	2 752,7±1 152,5 1 122,9÷5 321,1	1 984,9±707,4 728,5÷3 877,5	<0,0005
PMA (mVxmin) (n = 46)	średnia ±SD min.+max	4 408,9±2 958,1 010,3÷4 679,3	1 922,2±1 315,5 638,5÷6 542,3	1 225,9±527,7 464,1÷2 836,6	<0,0005
Z (mVxmin) (n = 46)	średnia ±SD min.+max	1 7655,0±11 017,2 5 354,7÷59 049,4	9 644,2±5 663,8 2 491,7÷2 3756,0	7 374,8±4 102,0 1 844,0÷1 8927,8	<0,0005
<b>parametry chemiluminescencji (wartości maksymalne)</b>					
BS (mV) (n = 46)	średnia ±SD min.+max	80,9±45,2 21,9÷203,3	37,7± 9,4 12,2÷108,6	27,9±16,2 7,3÷105,0	<0,0005
fMLP (mV) (n = 46)	średnia ±SD min.+max	212,7±104,3 75,6÷597,6	127,6±57,9 46,7÷339,8	91,8±38,5 37,2÷220,4	<0,0005
PMA (mV) (n = 46)	średnia ±SD min.+max	280,9±195,3 59,3÷930,3	123,7±96,4 30,3÷452,0	76,5±41,2 25,5÷237,2	<0,0005
Z (mV) (n = 46)	średnia ±SD min.+max	944,8±515,0 313,1÷2 640,4	616,8±347,8 178,2÷1 760,6	458,0±253,1 115,7÷1 251,7	<0,0005
BS – bez stymulacji fMLP – stymulacja formilo-metionilo-leucylofenyloalaniną PMA – stymulacja octanem mirystynianu forbolu Z – stymulacja zymosanem *jednoczynnikowa analiza wariancji dla zmiennych zależnych					

spontanicznej (BS) oraz stymulowanej fMLP, PMA i zymosanem (Z).

## Dyskusja

W pracy wykazano, że antyoksydacyjne efekty HTZ zależą od czasu jej stosowania. Im dłuższy był czas stosowania terapii, tym zahamowanie generacji reaktywnych form tlenu było większe.

Tranquilli, Mazzanti i Cugini [13] oceniali wpływ hormonalnej terapii zastępczej na generację wolnych rodników w błonach płytek krwi kobiet w okresie około- i pomenopauzalnym. U 12 kobiet przez 25 dni zastosowali HTZ, której komponentą estrogenową był estradiol stosowany przezskórnie w dawce 50 µg/dzień. Peroksydację lipidów oznaczali w próbkach krwi pobranych w 0., 12. i 25. dniu terapii za pomocą spektrofotometrycznej oceny generacji sprzężonych dniów. Stwierdzili zmniejszenie peroksydacji lipidów po włączeniu HTZ tym większe, im dłuższy był czas stosowania terapii.

Wnioski te potwierdzają badania przeprowadzone przez Sack, Rader i Cannon III [14], którzy oznaczali pe-

roksydację LDL wywołaną jonami miedzi w próbkach krwi 18 kobiet otrzymujących HTZ w postaci iniekcji, a następnie w formie przezskórnej. Próbki krwi pobierane były w chwili 0, po iniekcji, po 3 tyg. terapii przezskórnej oraz po miesiącu terapii. Miarą peroksydacji był również czas generacji sprzężonych dniów, oznaczanych spektrofotometrycznie. Zmniejszenie peroksydacji było również zależne od czasu stosowania terapii.

W innym modelu *in vivo* u 11 kobiet pomenopauzalnych podawano HTZ, w której komponentą estrogenową był walerianian estradiolu podawany przez 21 dni. Próbki krwi pobierano celem badania oksydacji LDL. Stwierdzono wydłużenie czasu oksydacji LDL, zależne od czasu stosowania preparatu, w porównaniu z grupami kontrolnymi, świadczące o hamującym wpływie estrogenów na oksydację LDL [15].

Mimo potwierdzenia antyoksydacyjnego działania estrogenów, w literaturze naukowej brakują prac badających to zjawisko przy użyciu metod bezpośrednio określających stopień generacji RFT. W większości stosowane są metody badające skutki działania wolnych rodników, jak np. oceniające peroksydację lipidów przy



pomocy dialdehydu malonowego (MDA) oraz metody oceniające stan układów antyoksydacyjnych w postaci, np. aktywności odpowiednich enzymów. Większość prac stanowią badania *in vitro*, które nie zostały tutaj

przytoczone. W badaniach *in vivo* zwraca uwagę mała liczba prac klinicznych. W pracach tych badane grupy nie są zbyt liczne, a oznaczenia przeprowadzone są najczęściej tylko przed terapią i po jej zakończeniu.

### Summary

*Some effects of HRT may be caused by an antioxidative action of estrogens, which prevent cellular oxidative damage by diminishing the generation of reactive oxygen intermediates (ROI).*

**Aim of study:** *Evaluation of hormonal replacement therapy (HRT) antioxidative effect in postmenopausal women in relation to the therapy duration.*

**Material and methods:** *Study group consists of 46 postmenopausal women. The mean age was 54.0±5.1 years. ROI generation was evaluated in 20 µl peripheral blood samples. Spontaneous ROI generation and generation after neutrophils activation with stimulators: formyl-metionyl-leucylphenylalanin (fMLP), phorbol acetate (PMA) and zymosan was measured. As an enhancer of chemiluminescence luminol was used. Chemiluminescence associated with oxydation burst was measured with Luminometr 1251, BioOrbit, Turku, Finland in stable temperature during 30 minutes (15 readings). Measurements were performed before applying continuous estrogen-progestin hormonal replacement therapy, after 3 and 6 months of this therapy.*

**Results:** *ROI generation by neutrophils was lower in patients using HRT during 6 months than in the same women after 3 months on this therapy.*

**Conclusion:** *The longer the HRT duration, the lower the reactive oxygen intermediates' generation..*

**Key words:** *hormonal replacement therapy, reactive oxygen intermediates*

### Piśmiennictwo

1. Miller RA, Britigan BE. *The formation and biologic significance of phagocyte-derived oxidants.* J Invest Med 1995; 43, 1: 39-48.
2. Keller JN, Germeyer A, Begley JGAD. *17Beta-estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid beta-peptide and iron.* J Neurosci Res 1997 15; 50 (4): 522-30.
3. Silbiger SR, Neugrten J. *The impact of gender on the progression of chronic renal disease.* Am J Kidney Dis 1995; 25 (4): 515-533.
4. Simpson PJ, Lucchesi BR. *Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury.* J Lab Clin Med 1987 Jul. 110 (1): 13-30.
5. Clemente C, Caruso MG, Berloco P, et al. *Antioxidant effect of short-term hormonal treatment in postmenopausal women.* Maturitas 1999 31: 137-42.
6. J, Mc Eneney J, Young IS, Thopson W. *The effect of various oestrogens and progestogens on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in vitro.* Maturitas 1996, 25 (2): 125-31.
7. Sack MN, Rader DJ, Cannon III RO. *Estrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women.* Lancet 1994; 343: 269-70.
8. 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.
9. Sacks FM, Gerhard M, Walsh BW. *Sex hormones, lipoproteins and vascular reactivity.* Curr Opin Lipidol 1995; 6 (3): 161-6.
10. Kim YD, Chen B, Beauregard E, et al. *17-beta-Estradiol prevents dysfunction of canine coronary endothelium and myocardium and reperfusion arrhythmias after brief ischemia/reperfusion.* Circulation 1996; 94 (11): 2901-8.
11. Behl C, et al. *Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship.* Mol. Pharmacol. 1997, 51 (4): 535-41.
12. Regan RF, Guo Y. *Estrogens attenuate neuronal injury due to hemoglobin, chemical hypoxia, and excitatory amino acids in murine cortical cultures.* Brain Res 1997, 764 (1-2): 133-140.
13. Tranquilli AL, Mazzanti L, Cugini M. *Transdermal estradiol and medroxyprogesterone acetate in hormone replacement therapy are both antioxidants.* Gynecol Endocrinol 1995; 9: 137-41.
14. Sack MN, Rader DJ, Cannon III RO. *Estrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women.* Lancet 1994; 343: 269-70.
15. Schroder J, et al. *Are the antioxidative effects of 17beta-estradiol modified by concomitant administration of a progestin.* Maturitas 1996 25 (2): 133-9.

### Adres autora

dr n. med. Tomasz Stetkiewicz  
Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy  
ul. Rzgowska 281/289  
93-338 Łódź

