

OCENA EKSPRESJI CZYNNIKA MARTWICY NOWOTWORU (TNF) ORAZ INTERLEUKINY-6 (IL-6) PRZED I W TRAKCIE STOSOWANIA HORMONALNEJ TERAPII ZASTĘPCZEJ (HTZ) U KOBIET W WIEKU POMENOPAUZALNYM

Dominik Rachoń²⁰

Zakład Immunologii, Katedra Histologii i Immunologii, Akademia Medyczna w Gdańsku

1 WSTĘP

Wyniki licznych badań wskazują, iż hormony płciowe wywierają duży wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego. U kobiet po menopauzie w wyniku spadku produkcji hormonów jajnikowych dochodzi do szeregu zaburzeń endokrynnych i metabolicznych prowadzących do wzrostu ryzyka występowania miażdżycy tętnic leżącej u podstaw choroby niedokrwiennej serca, osteoporozy oraz choroby Alzheimera [1, 3, 5, 9]. Z drugiej strony w patogenezie tych chorób dużą rolę odgrywa wzmożona aktywność prozapalna układu odpornościowego [7, 5, 6]. Wiadomo także, że stosowanie hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) u kobiet po menopauzie może zapobiegać występowaniu powyższych schorzeń bądź spowolnić ich przebieg [8, 2, 4, 9]. Przypuszcza się więc, iż estrogeny, poza swoim działaniem bezpośrednim, mogą także pośrednio wpływać na zmniejszenie ryzyka rozwoju późnych następstw menopauzy poprzez regulację ekspresji hormonopodobnych peptydów i niskocząsteczkowych białek określanych mianem cytokin i odgrywających dużą rolę we wszystkich reakcjach zapalnych.

Celem niniejszej pracy była więc ocena wpływu menopauzy oraz stosowania HTZ na ekspresję dwóch cytokin odgrywających potencjalną rolę w patogenezie późnych następstw menopauzy: czynnika martwicy guza (TNF) oraz interleukiny-6 (IL-6).

2 MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

2.1 *Material badawczy*

Do badań zakwalifikowano dziewięćdziesiąt osiem zdrowych kobiet w wieku pomenopauzalnym z objawami niedoboru estrogenów (45-71 lat) oraz siedemdziesiąt trzy zdrowe, regularnie miesiączkujące ochotniczki w wieku od 19 do 32 lat. Po wykluczeniu przeciwwskazań, wszystkim kobietom z grupy pomenopauzalnej zaproponowano rozpoczęcie HTZ. Spośród dziewięćdziesięciu ośmiu z nich tylko czterdzieści dwie wyraziły chęć poddania się tego rodzaju terapii (42.8%). U dziesięciu z nich zastosowano HTZ drogą doustną, natomiast u trzydziestu dwóch drogą parenteralną. Wszystkie zastosowane preparaty zawierały naturalny 17 β -estradiol w porównywalnych dawkach dobowych. Kobietom z zachowaną macicą, które przyjmowały preparat zawierający sam E2, celem ochrony endometrium, dodatkowo przez 10 dni w miesiącu podawano doustnie 10mg octanu medroksyprogesteronu. Pacjentki przychodziły na kolejne wizyty lekarskie po trzech, sześciu i dwunastu miesiącach stosowania terapii. Z pobranej podczas kolejnych wizyt krwi żyłnej izolowano surowice oraz jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC), w których badano ekspresję genów dla TNF oraz IL-6 metodą RT-PCR. Wyizolowane PBMC w stężeniu 10⁶/ml, inkubowano przez 24h bez lub z dodatkiem lipopolisacharydu (LPS), w dawce 10ng/ml. Zakładano także 24h hodowle PBMC z dodatkiem różnych stężeń: 17 β -estradiolu (E2), progesteronu (PG), norethisteronu (NETS) oraz dexamethasonu (DEXA). W zebranych surowicach oraz nadsączach z hodowli PBMC

²⁰ Dominik Rachoń był stypendystą „Fundacji na rzecz Nauki Polskiej” – Stypendium Krajowe dla Młodych Naukowców na rok 2004.

oznaczano bioaktywne poziomy TNF oraz IL-6 przy użyciu linii komórkowych wrażliwych na te cytokiny (*bioassay*). Do oznaczenia bioaktywnych poziomów TNF użyto linii komórkowej WEHI 164, natomiast do oznaczeń IL-6 linii B9. Oznaczeń poziomów folikulotropiny (FSH) oraz E2 dokonano metodą immuno-enzymatyczną przy użyciu komercyjnych zestawów firmy Biosource (Nivelles, Belgia) według wskazówek producenta.

2.2 Analiza statystyczna otrzymanych wyników

Wszystkich analiz statystycznych dokonano przy użyciu programu *STATISTICA*. Testowanie normalności rozkładu przeprowadzono przy użyciu testu W Shapiro-Wilka. Za miarę tendencji centralnej przyjęto medianę, a rozstęp międzykwartylowy został użyty jako miara rozproszenia. Ze względu na to, iż zmierzone zmienne nie spełniały założenia normalności rozkładu, w testowaniu hipotez statystycznych posłużono się testami nieparametrycznymi. Literą „N” oznaczono liczbę przypadków w danym teście. Wartość $P < 0.05$ przyjęto za znamienne statystycznie. W zależności od modelu doświadczalnego zastosowano następujące testy:

- porównywanie dwóch prób niezależnych mierzonych w skali nominalnej: test χ^2 Pearsona lub test χ^2 z poprawką Yatesa (jeśli liczebność grupy $N > 40$ i którakolwiek z liczebności oczekiwanych < 5 lub $20 < N \leq 40$ i wszystkie liczebności oczekiwane > 5) lub dokładny dwustronny test Fishera (jeśli $20 < N \leq 40$ i którakolwiek z liczebności oczekiwanych < 5 lub $N \leq 20$);
- porównywanie dwóch prób niezależnych mierzonych w skali interwałowej lub porządkowej: test U Manna-Whitneya;
- porównywanie dwóch prób zależnych mierzonych w skali nominalnej: test McNemara;
- porównywanie dwóch prób zależnych mierzonych w skali interwałowej lub porządkowej: test kolejności par Wilcoxon;
- ocena wpływu wybranych zmiennych objaśniających (niezależnych) na wartość zmiennej zależnej: metoda analizy regresji wielokrotnej.

3 WYNIKI

3.1 Ocena ekspresji genu dla TNF oraz IL-6

W wyniku przeprowadzonych analiz ekspresji genu dla badanych cytokin w PMBC kobiet w wieku pomenopauzalnym z klinicznymi objawami niedoboru estrogenów i niestosujących HTZ wykazano znamienne częstsze występowanie jej dodatnich wyników, zarówno dla genu dla TNF, jak i IL-6, w porównaniu z kobietami młodymi. Badając ekspresję *in vitro* powyższych cytokin na poziomie bioaktywnego białka w hodowlach PBMC, stwierdzono, iż w grupie kobiet niepalących, zarówno spontaniczna, jak i stymulowana LPS-em produkcja TNF oraz IL-6 przez PBMC kobiet pomenopauzalnych była istotnie większa w porównaniu do kobiet młodych. U kobiet po menopauzie, stwierdzono także znamienne wyższe surowicze poziomy bioaktywnego TNF i IL-6.

Badając wpływ wybranych zmiennych klinicznych na podwyższone poziomy TNF, oraz IL-6 w surowicy krwi kobiet pomenopauzalnych, wykazano, iż w znacznym stopniu korelują one z długością okresu od menopauzy. Surowicze poziomy bioaktywnej IL-6 w tej grupie kobiet były ponadto silnie dodatnio skorelowane z wartościami wskaźnika masy ciała (BMI). Palenie papierosów miało istotny wpływ na poziomy TNF i IL-6 w surowicy. Dodatni wynik ekspresji genu dla TNF w PMBC kobiet z grupy pomenopauzalnej miał także istotny wpływ na wysoką bioaktywność tej cytokiny w surowicy (tabela 1).

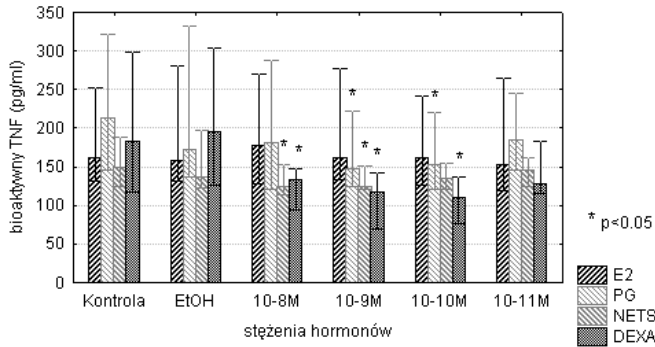
Tabela 1. Wpływ parametrów klinicznych na surowicze poziomy TNF oraz IL-6 u kobiet pomenopauzalnych.

	TNF		IL-6	
	β	P	β	P
Czas od menopauzy	0,234	0,031	0,208	0,039
BMI	-0,038	0,720	0,303	0,003
Palenie papierosów*	0,249	0,020	0,215	0,041
Poziom FSH	0,109	0,327	0,142	0,181
Poziom E2	-0,075	0,499	-0,022	0,831
Ekspresja genu danej cytokiny w PBMC*	0,259	0,018	0,170	0,114

B – współczynnik regresji, wartość $P < 0,05$ przyjęto za istotną statystycznie; * zmienne zebrane w skali nominalnej (palenie papierosów oraz ekspresja genu) były włączone do analizy w postaci numerycznej: 1 – obecność danej cechy oraz 0 – brak danej cechy.

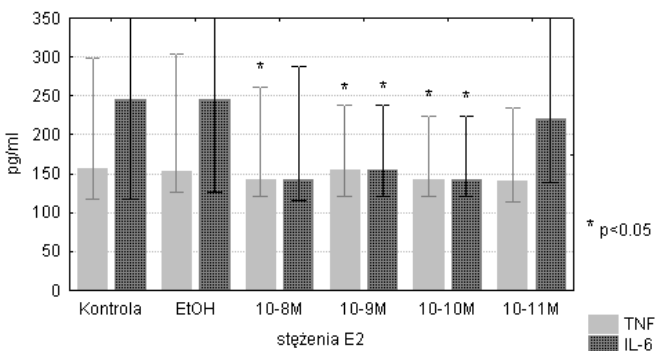
3.2 Ocena wpływu E2, PG i NETS na produkcję *in vitro* bioaktywnego TNF oraz IL-6 przez PBMC kobiet z grupy pomenopauzalnej

W grupie kobiet pomenopauzalnych, spontaniczna produkcja *in vitro* bioaktywnego TNF przez PBMC była istotnie mniejsza w obecności PG w stężeniach 10^{-9} M i 10^{-10} M oraz NETS w stężeniach 10^{-8} M oraz 10^{-9} M (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ E2, PG, NETS oraz DEXA na spontaniczną produkcję *in vitro* bioaktywnego TNF przez PBMC kobiet z grupy pomenopauzalnej.

Ponadto w tej grupie kobiet NETS w stężeniu 10^{-9} M zmniejszał spontaniczną produkcję bioaktywnej IL-6. DEXA w stężeniach 10^{-10} M- 10^{-8} M znamienne hamował spontaniczną produkcję bioaktywnego TNF oraz IL-6. Inkubacja PBMC kobiet pomenopauzalnych z E2 w stężeniach 10^{-10} M- 10^{-8} M istotnie zmniejszała spontaniczną produkcję bioaktywnego TNF oraz w stężeniach 10^{-9} M i 10^{-8} M bioaktywnej IL-6, ale tylko przez PBMC kobiet z niskimi stężeniami E2 w surowicy (<33pmol/l) (rys. 2).



Rys. 2. Wpływ E2 na spontaniczną produkcję *in vitro* bioaktywnego TNF oraz bioaktywnej IL-6 przez PBMC kobiet z grupy pomenopauzalnej z niskimi poziomami E2 w surowicy (<33pmol/l).

3.3 Ocena ekspresji genu dla TNF oraz IL-6 u kobiet pomenopauzalnych w trakcie stosowania HTZ

Kolejnym etapem badań była ocena ekspresji genu dla TNF oraz IL-6 w PBMC kobiet pomenopauzalnych w trakcie dwunastu miesięcy stosowania HTZ. Stwierdzono, iż odsetek dodatnich wyników ekspresji genu dla TNF zmniejszył się istotnie po sześciu i dwunastu miesiącach trwania terapii tylko u kobiet niepalących (tabela 2). Także po dwunastu miesiącach stosowania HTZ u kobiet, które nie paliły papierosów, doszło do istotnego spadku odsetka dodatnich wyników ekspresji genu dla IL-6 (tabela 3).

Tabela 2. Ocena ekspresji genu dla TNF w PBMC kobiet w wieku pomenopauzalnym w trakcie stosowania HTZ.

	Odsetek dodatnich wyników w badanych próbkach			
	Przed HTZ N=41	Po 3 m HTZ N=36	Po 6 m HTZ N=40	Po 12 m HTZ N=38
U wszystkich kobiet	19/41 (46%)	12/36 (33%)	15/40 (37%)	17/38 (45%)
U palących	11/20 (55%)	6/19 (31%)	10/18 (55%)	12/19 (63%)
U niepalących	8/21 (38%)	6/17 (35%)	5/22 (23%)*	5/19 (26%)*

m – miesiącach, N – liczba zbadanych próbek; * $p < 0,05$ w stosunku do wyniku sprzed rozpoczęcia HTZ. Różnice pomiędzy grupami oceniano testem McNemara (A/D).

Tabela 3. Ocena ekspresji genu dla IL-6 w PBMC kobiet w wieku pomenopauzalnym w trakcie stosowania HTZ.

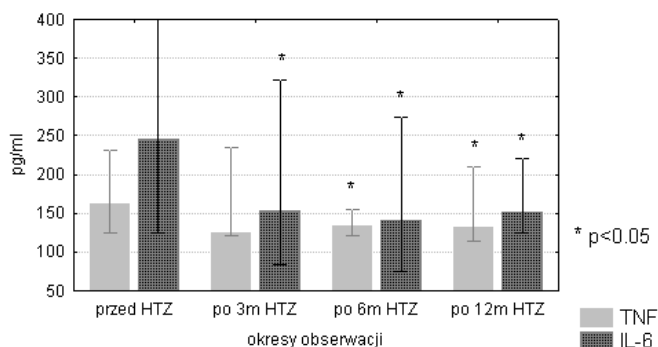
	Odsetek dodatnich wyników w badanych próbkach			
	Przed HTZ N=41	Po 3 m HTZ N=36	Po 6 m HTZ N=40	Po 12 m HTZ N=38
U wszystkich kobiet	22/41 (51%)	20/36 (55%)	17/40 (42%)	15/38 (39%)
U palących	12/20 (60%)	12/19 (63%)	11/18 (61%)	11/19 (58%)
U niepalących	10/21 (48%)	8/17 (47%)	6/22 (27%)	4/19 (21%)

m – miesiącach, N – liczba zbadanych próbek; * $p < 0,05$ w stosunku do wyniku sprzed rozpoczęcia HTZ. Różnice pomiędzy grupami oceniano testem McNemara (A/D).

3.4 Ocena bioaktywnych poziomów TNF i IL-6 w nadsączach z nad hodowli PBMC kobiet pomenopauzalnych w trakcie stosowania HTZ

Badając stężenia bioaktywnego TNF oraz IL-6 w nadsączach z nad hodowli PBMC kobiet stosujących HTZ, zaobserwowano, iż są one także istotnie niższe w porównaniu do okresu sprzed rozpoczęcia terapii. Różnice te były istotne

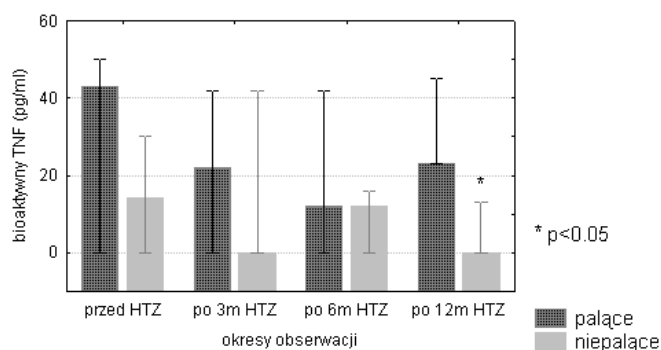
statystycznie już po trzech miesiącach w przypadku IL-6 oraz sześciu w przypadku TNF (rys. 3). Nie zaobserwowano natomiast wpływu stosowania HTZ na stymulowaną LPS-em produkcję *in vitro* powyższych cytokin przez PBMC.



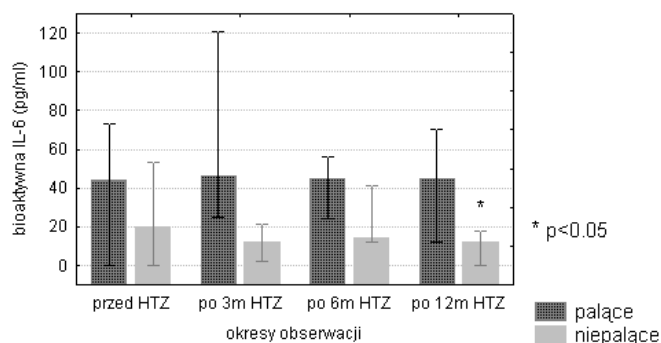
Rys. 3. Ocena spontanicznej produkcji *in vitro* bioaktywnego TNF i IL-6 przez PBMC kobiet pomenopauzalnych w trakcie stosowania HTZ.

3.5 Ocena poziomów bioaktywnego TNF oraz IL-6 w surowicy kobiet pomenopauzalnych w trakcie stosowania HTZ

Ostatnim etapem badań była ocena poziomów bioaktywnego TNF i IL-6 w surowicy krwi kobiet stosujących HTZ.



Rys. 4. Poziomy bioaktywnego TNF w surowicy krwi kobiet pomenopauzalnych w trakcie stosowania HTZ.



Rys. 5. Poziomy bioaktywnej IL-6 w surowicy krwi kobiet pomenopauzalnych w trakcie stosowania HTZ.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż po dwunastu miesiącach stosowania HTZ surowicze poziomy bioaktywnego TNF oraz IL-6 są istotnie niższe w porównaniu do okresu sprzed rozpoczęcia terapii, ale tylko wśród kobiet niepalących papierosów (rys. 4, 5).

4 WNIOSKI

Wyniki powyższych badań wskazują, iż menopauza wiąże się z nadekspresją TNF oraz IL-6, natomiast stosowanie HTZ zapobiega tym zmianom. Ponieważ zarówno TNF jak i IL-6 zdają się odgrywać dużą rolę w patogenezie późnych następstw menopauzy, do których zalicza się chorobę niedokrwienną serca, osteoporozę oraz chorobę Alzheimera, można przypuszczać, iż działanie to jest jednym z pośrednich mechanizmów ochronnego wpływu HTZ przed rozwojem tych schorzeń.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Golden S.H., Maguire A., Ding J., Crouse J.R., Cauley J.A., Zaccaro H., Szklo M. 2002 Endogenous postmenopausal hormones and carotid atherosclerosis: a case-control study of the atherosclerosis risk in communities cohort. *Am J Epidemiol.* 155(5), 437-45.
- 2) Hodis H.N., Mack W.J., Lobo R.A., Shoupe D., Sevanian A., Mahrer P.R., Selzer R.H., Liu C.R., Liu C.H., Azen S.P. 2001 Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial Research Group. Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 135(11), 939-53.
- 3) Holm P. Effect of estrogen on development of atherosclerosis. A review of experimental animal studies. 2001 *Dan Med Bull.* 48(3), 146-60. Review.
- 4) Lindsay R., Hart D.M., Clark D.M. 1984 The minimum effective dose of estrogen for prevention of postmenopausal bone loss. *Obstet Gynecol.* 63(6), 759-63.
- 5) Manolagas S.C., Jilka R.L. 1995 Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 332(5), 305-11. Review.
- 6) Mrak R.E., Sheng J.G., Griffin W.S. 1995 Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum Pathol.* 26(8), 816-23. Review.
- 7) Ross R. 1999 Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 138(5 Pt 2), S419-20. Review.
- 8) Stampfer M.J., Colditz G.A. 1991 Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med.* 20(1), 47-63.
- 9) Tang M.X., Jacobs D., Stern Y., Marder K., Schofield P., Gurland B., Andrews H., Mayeux R. 1996 Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet.* 348(9025), 429-32.