

Wpływ hormonalnej terapii menopauzalnej na ekspresję receptora estrogenowego β w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej u kobiet w okresie menopauzy*

The effect of hormone therapy on estrogen receptor- β expression in oral cavity mucous membrane epithelium in menopausal women

Beata Sawczuk¹, Maria Gołębiewska¹, Andrzej Mazurek², Lech Chyczewski³, Magdalena Garbowicz³

¹ Zakład Protetyki Stomatologicznej UMB
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *M. Gołębiewska*

² Klinika Ginekologii USK
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *P. Knapp*

³ Z Zakładu Klinicznej Biologii Molekularnej UMB
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *L. Chyczewski*

HASŁA INDEKSOWE:

receptor estrogenowy, menopauza, błona śluzowa jamy ustnej

KEY WORDS:

estrogen receptor, menopause, oral mucosa

Streszczenie

W okresie klimakterium ilość estrogenu produkowanego przez jajniki zmniejsza się, doprowadzając do wielu objawów ze strony tkanek estrogenozależnych, czyli bogato wyposażonych w receptor estrogenowy. Badaniami objęto grupę 60 kobiet, poddanych hormonalnej terapii menopauzalnej drogą doustną, transdermalną i dopochwową. Oceniono poziom ekspresji $Er\beta$ w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej w kolejnych pomiarach. Największy wzrost ekspresji występował u pacjentek stosujących terapię doustną i transdermalną.

Summary

During menopause estrogen produced by the ovaries decreases, leading to multiple manifestations of the estrogen-dependent tissues, which is lavishly fitted with estrogen receptor. The study group comprised 60 women treated with menopausal hormone therapy via oral, transdermal, and vaginal routes. $Er\beta$ expression levels were evaluated in the epithelium of oral mucosa with subsequent measurements. The highest increase in expression occurred in patients using oral and transdermal therapies.

*Praca wygłoszona na XXVIII Konferencji Naukowo-Szkoleniowej Sekcji Protetyki PTS, Centrum Kongresowe Ossa k/Rawy Mazowieckiej 14-16 październik 2010r.

Klimakterium jest kilkunastoletnim okresem w życiu kobiety, dla którego charakterystyczne jest narastanie niewydolności hormonalnej jajników. Menopauza to przerwa po ostatnim krwawieniu. Może powstawać w sposób naturalny lub przedwcześnie w wyniku chirurgicznego usunięcia jajników lub ich uszkodzenia chemio- i radioterapią. Obecnie występuje między 45-65 rokiem życia kobiety. Menopauza spowodowana jest stopniowym i nieodwracalnym zanikiem układu oddziaływania hormonalnego pomiędzy podwzgórzem, przysadką i jajnikami (1). W okresie klimakterium ilość estrogenów produkowanych przez jajniki zmniejsza się doprowadzając do wielu objawów ze strony tkanek estrogenozależnych, czyli bogato wyposażonych w receptor estrogenowy. Błona śluzowa jamy ustnej jest wrażliwa na spadek stężenia estrogenów. W wyniku obniżenia ich poziomu klinicznie stwierdza się ścieńczenie, suchość i błądź błony śluzowej oraz słabsze unaczynienie (2, 3). Nabłonek staje się przepuszczalny dla szkodliwych substancji oraz podatniejszy na urazy mechaniczne. Zmniejszona możliwość samooczyszczania wpływa na zwiększoną kolonizację i penetrację powierzchni nabłonka przez drobnoustroje i grzyby. Zmniejsza się zdolność gojenia ran (4, 5). W 1996 roku w kilku laboratoriach niezależnie wykryto u szczura, myszy i człowieka drugi specyficzny receptor oznaczony jako receptor estrogenowy β ($Er\beta$) (6,7,8). Receptor estrogenowy β może funkcjonować jako czynnik transkrypcyjny i jako receptor błonowy. Wewnątrz komórki jest zlokalizowany w cytoplazmie, a dopiero jako kompleks receptor-hormon wędrują do jądra i tu osiąga zdolność do oddziaływania z DNA oraz regulowania transkrypcji. $Er\beta$ dominuje w układzie rozrodczym żeńskim: komórkach ziarnistych jajnika, komórkach zrębu, ciała żółtego, komórkach nabłonka a także w skórze (nabłonku i skórze właściwej) oraz w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej i gruczołach ślinowych (9, 10, 11, 12).

Stosowanie hormonalnej terapii menopauzalnej (HTM) polega na zastąpieniu naturalnej czynności jajników poprzez podawanie estrogenów i progesteronu lub jego pochodnych (progestagenów) w minimalnie skutecznych dawkach. Preparaty mogą być podawane drogą doustną w postaci tabletek, transdermalną – plastrów przezskórnych lub dopochwową – globulek dopochwowych. Terapia

doustna jest najczęstszą formą HTM. Zaletą jest łatwość stosowania, możliwość korygowania dawki, dobra tolerancja leku oraz możliwość szybkiego wstrzymania leczenia. Do cech niekorzystnych tej terapii należy zaliczyć zwiększone stężenie leku bezpośrednio po przyjęciu, gorsze wchłanianie przy schorzeniach jelita cienkiego i antybiotykoterapii. Zaletą terapii transdermalnej jest omińnięcie w pierwszym etapie wątroby a także wyeliminowanie niekorzystnych objawów podrażnienia przewodu pokarmowego. Niekorzystne działanie to obwodowe działanie estrogenów w postaci zwiększonego napięcia gruczołów piersiowych, wrażliwości brodawek sutkowych, skurczu mięśni nóg, przyrostu masy ciała. Obserwuje się również objawy podrażnienia skóry, związane z reakcją na alkohol stanowiący nośnik estrogenów lub na klej służący do przyklejania płatków. Dopochwowe podawanie estrogenów stosowane w postaci kremu, żeli i globulek zalecane jest u kobiet starszych, niechętnych do HTM. Terapia ta jest łatwa w stosowaniu, nie powoduje krwawień, jej działanie ogranicza się tylko do nabłonka pochwy. Wybór drogi podania hormonów jest uzależniony od ogólnego stanu zdrowia pacjentki, przyzwyczajenia i dotychczasowych doświadczeń. Pacjentka podczas stosowania HTM powinna być pod opieką lekarza prowadzącego (1, 13).

Celem pracy była ocena wpływu hormonalnej terapii menopauzalnej na ekspresję receptora estrogenowego β w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej u kobiet w okresie menopauzy.

Material i metoda

Badaniami objęto grupę 60 kobiet, które podzielono na trzy podgrupy w zależności od zastosowanej terapii hormonalnej. Średnia wieku badanych pacjentek stosujących terapię miejscową wynosiła 59 lat, terapię ogólną transdermalną 52 lata i ogólną doustną 53 lata. Materiał do badań stanowiły wymazy pobrane z błony śluzowej policzka przed terapią, 6 tygodni po rozpoczęciu terapii, 3, 6, 12 miesięcy po rozpoczęciu terapii. Receptor estrogenowy β identyfikowano przy pomocy liofilizowanych przeciwciał monoklonalnych mysich w reakcji immunohistochemicznej barwnej użytych w stężeniu 1:25. Analiza odczynów immuno-

Tabela I. Porównanie natężenia ekspresji Erβ w jamie ustnej względem czasu oraz rodzaju terapii (wartości p)

	Wpływ czasu	Wpływ interakcji czasu i terapii	Wpływ terapii
Brak natężenia	<0,0001 #	0,001 #	<0,0001 #
Natężenie ogólne	<0,0001 #	<0,0001 #	<0,0001 #
Natężenie 1	<0,0001 #	0,37	<0,0001 #
Natężenie 2	<0,0001 #	<0,0001 #	0,0025 #
Natężenie 3	0,0001 #	0,0004 #	0,14

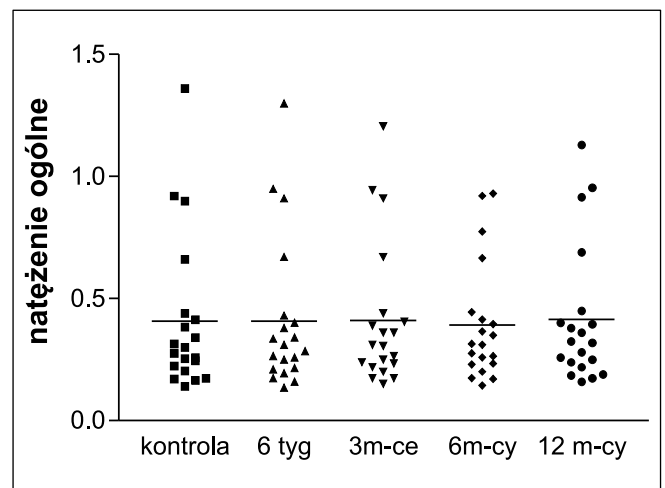
– różnice istotne statystycznie na poziomie istotności $p < 0,05$.

histochemicznych w badanych przypadkach została przeprowadzona przy użyciu mikroskopu świetlnego przy powiększeniu 600x. Nasilenie ekspresji receptora oceniano w postaci strąków barwnych w jądrach 200 różnych komórek w różnych polach widzenia w każdym preparacie. Dokonano podziału badanych komórek na przypadki z wysoką ekspresją receptora w jądrze komórkowym (3), średnią ekspresją (2), niską ekspresją (1), brakiem ekspresji (0). Liczono ilość komórek z różnym nasileniem ekspresji w każdym polu widzenia. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Wyniki

Porównanie natężenia ekspresji Erβ w jamie ustnej poprzez analizę barwnych strąków w jądrach 200 różnych komórek przedstawiono w tabeli I. Zaobserwowano, że w każdym przypadku czas terapii miał istotny wpływ na liczbę poszczególnych komórek oraz natężenie ogólne ekspresji Erβ ($p < 0,05$). W przypadku liczby komórek z natężeniem 1 nie stwierdzono istotnego wpływu interakcji czasu i terapii na otrzymane wyniki. W większości przypadków występował również istotny statystycznie wpływ terapii na otrzymane wyniki. Wyjątek stanowią komórki z natężeniem 3, dla których wpływ terapii nie był istotny ($p = 0,14$).

Poddano ocenie zmiany natężenia ogólnego Erβ w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej w kolejnych pomiarach w zależności od rodzaju HTM. Natężenie ogólne ekspresji Erβ w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej pod wpływem terapii miejscowej nie ulegało zmianie. Średnia

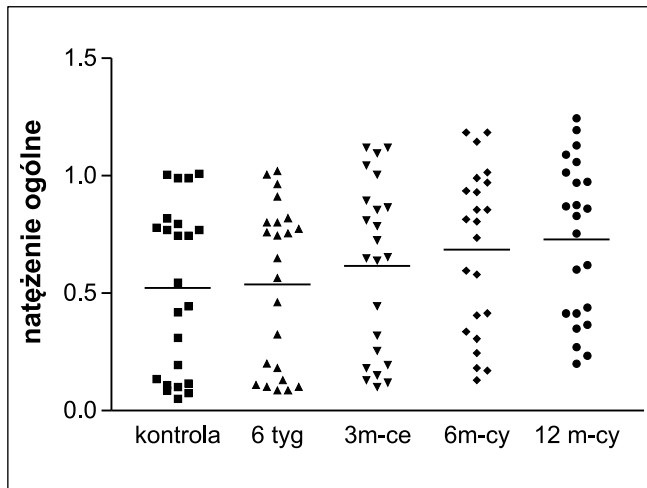


Ryc. 1. Czas trwania terapii miejscowej. Wpływ czasu na wyniki natężenia ogólnego ekspresji Erβ w jamie ustnej przy zastosowanej terapii miejscowej.

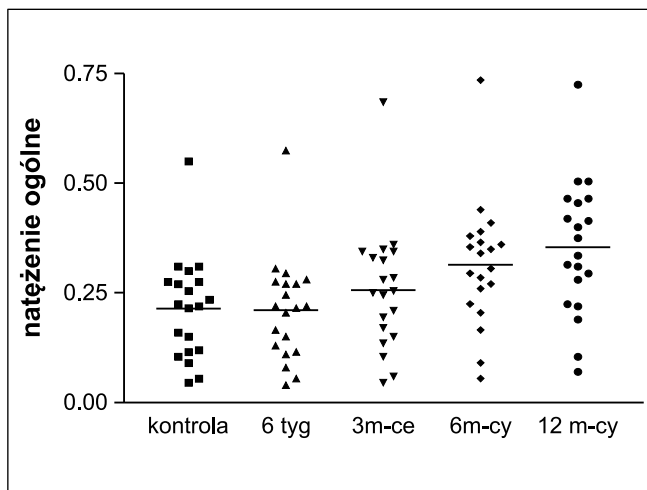
wartość natężenia ogólnego w kolejnych pomiarach osiągała wartość porównywalną do wartości kontrolnej (przed terapią) (ryc. 1).

Pod wpływem terapii doustnej natężenie ogólne ekspresji Erβ ulegało zmianie w kolejnych pomiarach. Średnia wartość tego natężenia ulega niewielkiemu wzrostowi w kolejnych pomiarach (0,59; 0,66; 0,73; 0,77) w porównaniu z wartością kontrolną (0,58). Największy wzrost natężenia ogólnego występował po 3 miesiącach trwania terapii (ryc. 2).

Średnia wartość natężenia ogólnego ekspresji Erβ wzrastała w kolejnych pomiarach (0,21; 0,25; 0,34; 0,35) w porównaniu z wartością kontrolną (0,21). Największy wzrost natężenia ogólnego występował po 3 miesiącach terapii (ryc. 3).



Ryc. 2. Wpływ czasu na wyniki natężenia ogólnego ekspresji $Erb\beta$ w jamie ustnej przy zastosowanej terapii doustnej.



Ryc. 3. Czas trwania terapii transdermalnej. Wpływ czasu na wyniki natężenia ogólnego ekspresji $Erb\beta$ w jamie ustnej podczas terapii transdermalnej.

Dyskusja

Menopauza zapoczątkowuje u kobiet okres, w którym dochodzi do szeregu zmian spowodowanych fizjologicznym niedoborem estrogenów. Zmiany te negatywnie wpływają na jakość życia, czyli prawidłowe funkcjonowanie fizyczne, emocjonalne i socjalne (14). Przemiany hormonalne dokonujące się w organizmie kobiety w czasie menopauzy prowadzą do szeregu zmian w wielu narządach wewnętrznych, skórze i błonie śluzowej. Błona śluzowa jamy ustnej reaguje na niedobór poziomu estrogenów atrofią nabłonka, ścięciem

i zmniejszeniem wilgotności. Wyniki badań naukowych zarówno doświadczalnych, klinicznych jak i epidemiologicznych wskazują na korzyści wynikające z zastępczego leczenia hormonalnego menopauzy (1, 15). Korzyści ze stosowania tej terapii oraz związane z nią objawy uboczne są analizowane w aspekcie lokalizacji, ekspresji i funkcji receptorów estrogenowych w różnych tkankach i narządach (9, 10, 16). Przez wiele lat uważano, że istnieje tylko jedna forma receptora estrogenowego, przez który estrogeny mogą oddziaływać na komórki (6). Po odkryciu istnienia nowej formy receptora estrogenowego w komórkach prostaty szczura, stwierdzono również obecność tego receptora u człowieka (17, 18). Wcześniej poznane i scharakteryzowane białko określono jako Era , zaś nowe jako $Erb\beta$. U kobiet występują dwa typy receptorów estrogenowych Era i $Erb\beta$ o różnej lokalizacji. Do oznaczania receptora estrogenowego najczęściej są wykorzystywane reakcje immunohistochemiczne, immunofluorescencyjne, hybrydyzacja in situ oraz metoda RT-PCR. Dotychczas powstało wiele publikacji opisujących umiejscowienie receptora estrogenowego w licznych narządach i tkankach organizmu ludzkiego. Natomiast niewiele publikacji dotyczy ekspresji receptora estrogenowego w tkankach jamy ustnej. Najwyższy poziom $Erb\beta$ zlokalizowano w jajniku, gruczole sutkowym, macicy, płucach, naczyniach krwionośnych, nadnerczach, tarczycy, skórze, błonie śluzowej jamy ustnej. Receptora $Erb\beta$ nie wykryto w mózgu i wątrobie.

Taylor i wsp. w swoich badaniach oceniali występowanie receptora $Erb\beta$ w różnych tkankach ludzkich przy użyciu immunohistochemii (17). *Ojanoko-Harri* i wsp. badali obecność receptorów androgenowych w błonie śluzowej jamy ustnej w biopsji policzka i dziąsła pobranych od zdrowych kobiet i mężczyzn. Badania immunohistochemiczne tych autorów wykazały brak receptora estrogenowego i progesteronowego oraz dominację receptora androgenowego we wszystkich warstwach nabłonka, zwłaszcza w warstwie podstawnej i fibroblastach. Autorzy są zdania, że niewykrycie receptora estrogenowego mogło być spowodowane zbyt małą czułością użytych przeciwciał (19).

Obecności receptora estrogenowego nie wykazała także *Leimola-Virtanen* i wsp. oceniając w 1997 r. w badaniach immunohistochemicznych błonę śluzową pobraną z biopsji policzka (20). Autorzy ci w 2000 r. ocenili ekspresję receptora estrogenowego w błonie śluzowej policzka i gruczołach ślinowych. Pozytywne wyniki uzyskano z zastosowaniem metody PCR i Western Blot, natomiast nie wykryto Er metodą immunohistochemii. Można przypuszczać, że przeciwciała użyte w reakcjach immunohistochemicznych nie związały się z właściwym antygenem receptora estrogenowego obecnym w błonie śluzowej policzka, bądź rozcieńczenie użytego przeciwciała było niewłaściwe albo poziom ekspresji tego receptora był poniżej wykrywalności.

Valimaa i wsp. w 2004 r. wykazali w błonie śluzowej jamy ustnej obecność Er β , natomiast nie potwierdzili występowania receptora Er α . Badania przeprowadzono w grupie 16 kobiet i 8 mężczyzn z wykorzystaniem biopsji błony śluzowej policzka, dziąsła oraz gruczołów ślinowych metodą immunohistochemiczną. Receptor Er β obecny był w jądrach komórek wszystkich warstw nabłonka włącznie z komórkami podstawnymi, a nie występował w komórkach powierzchniowych. Zaobserwowano większą ekspresję Er β w komórkach nabłonka dziąsła niż błony śluzowej policzka. Er β występował również w gruczołach ślinowych u 12 z 13 badanych pacjentek. Ekspresję Er β zaobserwowano nie tylko w jądrze, ale również w cytoplazmie komórek gruczołów ślinowych. Nie wykryto obecności Er α w gruczołach ślinowych jamy ustnej (21).

Forabosco i wsp. ocenili metodą immunohistochemiczną występowanie receptora estrogenowego w błonie śluzowej jamy ustnej kobiet w wieku rozrodczym oraz w okresie menopauzy. Pacjentki w okresie menopauzy zgłaszały liczne dolegliwości ze strony jamy ustnej. Autorzy nie określili rodzaju badanego receptora, można przypuszczać, opierając się na doniesieniach innych badaczy, że był to Er β . Receptor estrogenowy występował u 8 z 10 pacjentek w okresie menopauzy oraz u 6 z 10 kobiet płodnych. Ekspresja receptora estrogenowego była najbardziej intensywna w komórkach nabłonka jamy ustnej. Badania *Farabosco* sugerują związek między objawami klinicznymi i zmianami mikroskopowymi w błonie śluzowej jamy ustnej. Uważają, że recep-

tor estrogenowy występuje wybiórczo u niektórych kobiet, a identyfikacja tego receptora przy pomocy immunohistochemii może pomóc tym pacjentkom, dla których HTM będzie dobroczynna (22).

W badaniach własnych przeprowadzonych w grupie 60 kobiet w okresie menopauzy z zastosowaniem metod immunohistochemicznych stwierdzono występowanie receptora Er β w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej u wszystkich badanych pacjentek. Należy sądzić, iż rodzaj i jakość użytych przeciwciał oraz zastosowana metoda immunohistochemiczna, umożliwiającą dokładne zlokalizowanie receptora Er β w komórce, pozwoliły na jego wykrycie. Ekspresję receptora Er β zlokalizowano głównie w jądrze komórkowym, ale również obecna była na terenie cytoplazmy komórkowej. Przeprowadzone badania potwierdzają doniesienia *Forabosco* i *Valimaa* (22, 21). W przeprowadzonych badaniach własnych oceniono również ekspresję Er β pod wpływem zastosowanej terapii hormonalnej podawanej doustnie, transdermalnie i dopochwowo. Ekspresja receptora Er β w błonie śluzowej zmieniła się pod wpływem terapii doustnej i transdermalnej w porównywalnym stopniu, natomiast terapia hormonalna dopochwowa (miejscowa) zasadniczo nie wpłynęła na wzrost ekspresji receptora Er β w błonie śluzowej jamy ustnej. Największy wzrost ekspresji przy zastosowaniu terapii ogólnej (doustnej i transdermalnej) wystąpił po 3 miesiącach terapii i wykazywał tendencję wzrostową. Należy zatem oczekiwać, że poprawę stanu błony śluzowej jamy ustnej można uzyskać u kobiet stosując terapię hormonalną podawaną drogą doustną i transdermalną już po okresie około 3 miesięcy.

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski:

1. Pod wpływem hormonalnej terapii menopauzalnej ekspresja receptora Er β w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej u kobiet wzrastała, najlepsze wyniki uzyskano za pomocą terapii doustnej i transdermalnej.
2. W świetle przeprowadzonych badań dolegliwości okresu klimakterium jak piekąca jama ustna, suchość i drażliwość błony śluzowej jamy ustnej wydaje się być wskazaniem do wdrożenia hormonalnej terapii menopauzalnej metodą doustną i/lub transdermalną.

Piśmiennictwo

1. *Jakowicki J*: Klimakterium. Hormonalna terapia zastępcza. Poradnik terapeutyczny. Biofolium 2001.
2. *Buchanan J*: Burning mouth syndrome. *Oral Dis.*, 2006; 12 Suppl: 1-4.
3. *Miller I, Kurnatowska A, Miller A*: Zespół piekących ust – cechy kliniczne i współwystępowanie zaburzeń psychicznych. *Czas. Stomat.*, 2004; 12: 775-783.
4. *Bergdahl J, Anneroth G, Anneroth I*: Clinical study of patients with burning mouth. *Scand. J. Dent. Res.*, 1994; 102, 299-305.
5. *Sawczuk B, Mazurek M, Gołębiewska M*: Co stomatolog powinien wiedzieć na temat menopauzy. *Mag. Stomat.*, 2006; 5, 172, 82-83.
6. *Beato M, Truss M, Chavez S*: Control of transcription by steroid hormones. *Ann N Y Acad Sci Usa* 1996; 784: 93-123.
7. *Tkaczyk M, Kalita K*: Receptor estrogenowy beta – budowa, regulacja i funkcja. *Postępy Biochemii* 2001; 47, 1, 73-79.
8. *Jakimiuk A, Bogusiewicz M, Tarnowski R*: Ekspresja receptora estrogenowego alfa i beta w prawidłowych tkankach macicy u kobiet przed menopauzą. *Przeg. Menopauz.*, 2003; 6, 12-17.
9. *Brodowska A, Laszczyńska M, Starczewski A*: Zmiany lokalizacji i funkcji receptora estrogenowego alfa w jajniku kobiet po menopauzie w porównaniu z wiekiem rozrodczym. *Pol. Merk. Lek.*, 2000; 23, 135, 231-234.
10. *Brodowska A, Laszczyńska M, Starczewski A*: The localization of estrogen receptor alfa and its function in ovaries of postmenopausal women. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2007; 45, 4, 325-330.
11. *Słomczyńska M*: Receptory hormonów steroidowych – budowa i funkcja. *Postępy Biologii Komórki* 1995; 22, 1, 3-21.
12. *Taylor A. H., Al-Azzawi F*: Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J. Mol. Endocrinol.*, 2000; 24, 145-155.
13. *Skalba P*: Hormonalna terapia zastępcza PZWL 2005.
14. *Swartz D. P*: Human reproduction. The menopause in practical points in gynecology. Medical Examination Publishing Co New Hyde Park New York 1984, 85-94.
15. *Genazzani A., Gambacciani M*: HRT in the third millennium. *Maturitas* 2001; 38, 1, Supl: 49-55.
16. *Bilj P, Armorel D., Ivor O*: Permeation of 17 β -estradiol through human vaginal and buccal mucosa. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 1998; 85, 393-398.
17. *Taylor A. H., Al-Azzawi F*: Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J. Mol. Endocrinol.*, 2000; 24, 145-155.
18. *Mosselman S., Pohlman J., Dijkema R*: Er beta: identification and characterisation of novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392, 49-53.
19. *Ojanoko-Harri A., Forssell H., Laine M*: Immunohistochemical detection of androgen receptors in human oral mucosa. *Archs. Oral Biol.*, 1992; 37, 6, 511-514.
20. *Leimola-Virtanen R., Pennanen R., Syrjanen K*: Estrogen response in buccal mucosa – a cytological and immunohistological assay. *Maturitas* 1997; 27, 41-45.
21. *Valimaa H., Savolainen S., Soukka T*: Estrogen receptor beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. *Journal of Endocrinol*, 2004; 180, 55-62.
22. *Forabosco A., Criscuolo M., Coukos G*: Efficacy of hormone replacement therapy in postmenopausal women with oral discomfort. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 1992; 73, 570-574.

Zaakceptowano do druku: 10.II.2011 r.

Adres autorów: 15-276 Białystok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A.

© Zarząd Główny PTS 2011.