

EFEK KADAR SERUM ESTRADIOL FASE BLEEDING SIKLUS MENSTRUASI PADA AKTIVITAS FIBROBLAS DERMIS MANUSIA

Graciella Regina, Sri Awalia Febriana,* Yohanes Widodo Wirohadidjojo*

Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
FK Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya Jakarta
*FK Universitas Gadjah Mada/RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta

ABSTRAK

Pembedahan elektif selama fase bleeding siklus menstruasi sering dihindari terkait gangguan koagulasi. Salah satu hormon yang berhubungan dengan proses penyembuhan luka adalah estrogen. Kadar estrogen berfluktuasi sepanjang siklus menstruasi dan berada pada kadar terendah selama fase bleeding. Penelitian eksperimental *ex vivo* dilakukan pada 16 perempuan berusia 18–40 tahun yang memiliki siklus menstruasi teratur. Darah vena subjek diambil sebanyak 5ml pada fase bleeding dan ovulasi. Kemampuan penyembuhan luka dari masing-masing serum dinilai dengan mengukur proliferasi fibroblas dan deposisi kolagen fibroblas kulit. Ovulasi ditentukan dengan uji pakis saliva, kadar estradiol serum diukur menggunakan Cobas Elecsys®, proliferasi fibroblas menggunakan MTT assay, dan deposisi kolagen dengan sirius red. Hasil penelitian menunjukkan rerata kadar serum estradiol pada fase bleeding dan ovulasi berturut-turut adalah $29,6 \pm 10,5$ pg/dl dan $180,1 \pm 164,5$ pg/dl. Rerata indeks proliferasi fibroblas yang dipaparkan pada fase bleeding dan ovulasi adalah $1,09 \pm 0,63$ dan $1,44 \pm 0,66$. Rerata densitas optik kolagen fibroblas yang terpajan serum fase bleeding dan ovulasi adalah $0,47 \pm 0,2$ dan $0,54 \pm 0,14$. Seluruhnya menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Serum fase bleeding memiliki kemampuan penyembuhan luka yang lebih rendah dibandingkan dengan serum fase ovulasi. Kebijakan untuk tidak melakukan pembedahan elektif selama fase bleeding, selain terkait dengan gangguan pembekuan darah juga terkait dengan proses penyembuhan luka.

Kata Kunci: menstruasi, estradiol, ovulasi, proliferasi fibroblas, deposisi kolagen, penyembuhan luka

THE EFFECT OF ESTRADIOL SERUM IN BLEEDING PHASE OF MENSTRUATION CYCLE ON HUMAN DERMAL FIBROBLAST ACTIVITIES

ABSTRACT

Elective surgery during the menstrual cycle's bleeding phase is often avoided related to the disruption of coagulation. One of the hormones associated with wound healing is estrogen, which level fluctuates throughout the menstrual cycle, and is at the lowest level during bleeding phase. We conducted an *ex vivo* experimental study. Sixteen women aged 18 - 40 - years - old with regular menstrual cycle had 5 cc of their blood taken in the bleeding and ovulation phase. Serum healing ability was assessed by measuring proliferation of fibroblasts and collagen deposition of the skin fibroblast. Ovulation was determined using fern test, serum estradiol levels were measured using Cobas Elecsys®, fibroblast proliferation using MTT assay, collagen deposition using sirius red. The mean of serum estradiol levels on bleeding and ovulation phase was $29,6 \pm 10,5$ pg/dl and $180,1 \pm 164,5$ pg/dl respectively. The mean of fibroblasts index proliferation that were exposed to bleeding and ovulation serum was $1,09 \pm 0,63$ and $1,44 \pm 0,66$. The mean of optical density of collagen from fibroblasts that were exposed to bleeding and ovulation serum was $0,47 \pm 0,2$ and $0,54 \pm 0,14$. All results showed statistically significant differences ($p < 0,05$). Bleeding phase serum has lower healing ability than ovulation phase serum. Recommendation to not perform elective surgery in bleeding phase is also related to wound healing process.

Keywords: menstruation, estradiol, ovulation, fibroblast proliferation, collagen deposition, wound healing

PENDAHULUAN

Menstruasi adalah fenomena fisiologis pada perempuan usia reproduktif yang ditandai dengan siklus perdarahan pervaginam yang disebabkan fluktuasi hormon seks. Para ahli bedah biasanya menghindari pembedahan elektif pada fase bleeding siklus menstruasi terkait terganggunya koagulasi pada luka operasi.^{1,2} Faktor lain misalnya ambang nyeri terhadap penyuntikan premedikasi³, respons hemodinamik terhadap tindakan laringoskopi, dan intubasi trakea pada fase ini juga dapat mempengaruhi keputusan ahli anestesi.⁴

Beberapa penelitian menemukan bahwa estrogen dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka dengan meningkatkan sintesis kolagen^{5,6}, menghambat sintesis enzim matrix metalloproteinases (MMPs)^{5,7}, serta melindungi fibroblas dan keratinosit dari kerusakan oksidatif⁸ yang dapat memperpanjang fase inflamasi dan memicu terbentuknya ulkus kulit yang kronik.^{9,10} Diketahui pula bahwa kadar estradiol berada pada kadar terendah selama tujuh hari pertama siklus menstruasi¹¹, sehingga diduga bahwa perlukaan kulit pada fase bleeding dapat menyebabkan proses penyembuhan luka yang buruk.

Pada penelitian ini kami melaporkan indeks proliferasi fibroblas dan deposisi kolagen dari fibroblas dermis manusia yang dipajankan pada serum perempuan sehat saat fase bleeding dari siklus menstruasi. Dengan melaporkan hasil penelitian ini, diharapkan dapat menambah satu alasan lagi untuk tidak melakukan pembedahan pada perempuan yang sedang dalam fase *bleeding* siklus menstruasi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian eksperimental *ex vivo* dilakukan pada 16 perempuan usia subur sebagai subjek penelitian. Setiap subjek diambil darahnya sebanyak 5 ml pada awal fase bleeding (H1) dan fase ovulasi. Kriteria inklusi adalah subjek perempuan sehat berusia 18–40 tahun, memiliki siklus menstruasi teratur, dan bersedia mengikuti prosedur penelitian, misalnya pengambilan sampel darah. Kriteria eksklusi adalah subjek yang mengonsumsi obat-obatan yang mempengaruhi kadar estradiol dalam darah.

Fase ovulasi ditentukan dengan uji pakis (*fern test*), yaitu saliva subjek diperiksa di bawah mikroskop untuk menemukan gambaran daun pakis. Darah vena kemudian disentrifus dengan kecepatan 400G selama 10 menit sehingga terbentuk 3 lapisan, dan serum yang berada di bagian paling atas diambil. Sebanyak 0,5 ml serum diambil untuk diperiksa kadar estradiolnya, sedangkan sisanya digunakan untuk diperiksa kemampuan mitogeniknya. Kemampuan mitogenik dari serum dinilai dengan mengukur proliferasi fibroblas dan deposisi kolagen fibroblas kulit manusia setelah dipajankan selama 72 jam. Koleksi fibroblas kulit manusia didapatkan dari Laboratorium

Biologi Molekular Departemen Dermatologi dan Veneereologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari 2016 hingga Maret 2016 di Laboratorium Biologi Molekular Departemen Dermatologi dan Veneereologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Penelitian ini telah mendapatkan rekomendasi etik dari Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada (No: KE/FK/423/EC). Subjek penelitian ini telah menandatangani *informed consent*.

Prosedur pengukuran kadar estradiol serum

Darah vena dari 16 relawan perempuan sehat diambil sebanyak 5 ml antara pukul 08.00 – 09.00 pagi. Pengambilan darah dilakukan pada H1 dan fase ovulasi siklus menstruasi. Darah vena tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabung gelas tanpa antikoagulan, disentrifus pada 400 G selama 10 menit sehingga terbentuk 3 lapisan pada tabung gelas. Serum di bagian teratas kemudian diambil 0,5 ml untuk pemeriksaan kadar E2 menggunakan Cobas Elecsys® (RocheTM). Hasil pengukuran kadar E2 dinyatakan dengan satuan pg/ml.

Prosedur pengukuran jumlah kolagen non solubel dengan sirius red

Pengukuran kolagen non solubel dimulai dengan membuang medium dalam setiap sumuran microplate berisi fibroblas, kemudian setiap sumuran dicuci dengan 200 µl PBS. Suspensi fibroblas difiksasi dengan Bouin solution selama 1 jam kemudian dicuci dengan air mengalir hingga warna kuning menghilang. Sirius Red ditambahkan sebanyak 200 µl ke dalam setiap sumuran, kemudian diinkubasi selama 1 jam. Sirius red dibuang dan sumuran dicuci dengan HCl 0,1 N hingga sirius red hilang dari supernatan dan dinding sumuran. Natrium hidroksida 0,5 N kemudian ditambahkan sebanyak 200 µl dan dibiarkan selama 30 menit, lalu dilanjutkan dengan pembacaan menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 570 nm.

Prosedur penilaian proliferasi fibroblas menggunakan MTT assay

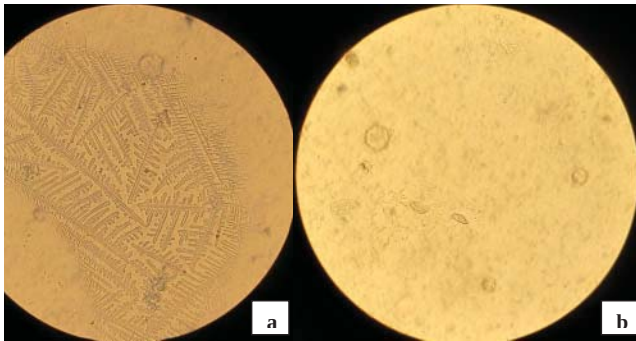
Pengukuran proliferasi fibroblas menggunakan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium (MTT) assay dimulai dengan membuang semua medium yang tersisa dalam sumuran di microwell plate, lalu ditambahkan 50 µl MTT dan 200 µl medium baru. Microplate kemudian dibungkus dengan lembar aluminium foil, dan diinkubasi selama 4 – 8 jam, selanjutnya MTT dan medium dibuang. 200 µl DMSO dan 25 µl glisin buffer ditambahkan pada setiap sumuran dan proliferasi

fibroblas dinilai dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm.

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk nilai rerata $\pm$ kesalahan baku. Analisis data dikerjakan menggunakan program komputer. Perbedaan kadar estrogen serum, indeks proliferasi fibroblas, dan densitas optik kolagen nonsolubel dari kelompok H1 dan kelompok fase ovulasi dianalisis dengan uji Wilcoxon signed rank test.

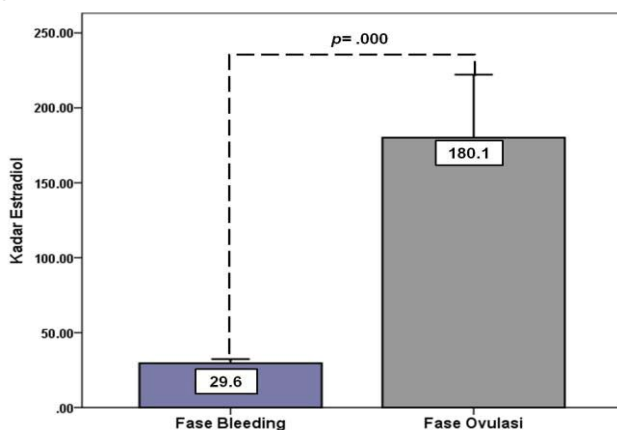
HASIL

Hasil tes saliva untuk menentukan masa subur atau fase ovulasi (*fern test*) menunjukkan gambaran daun pakis di bawah mikroskop, sedangkan pada fase *bleeding* gambaran daun pakis tidak ditemukan, seperti yang tampak pada gambar 1.



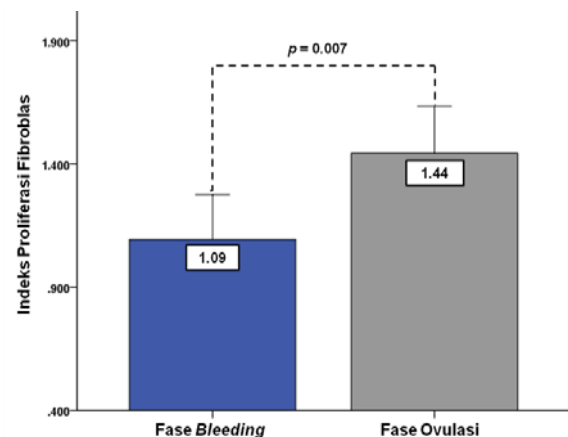
Gambar 1. Hasil fern test. 1a. Gambaran daun pakis pada saliva fase ovulasi. 1b. Tidak ditemukan gambaran daun pakis dari saliva pada fase *bleeding*.

Hasil pemeriksaan kadar estradiol dari serum fase *bleeding* memiliki rerata kadar $29,6 \pm 10,5$ pg/dl sedangkan rerata kadar estradiol serum ovulasi adalah $180,1 \pm 164,5$ pg/dl. Hasil analisis dengan uji Wilcoxon menunjukkan perbedaan rerata kadar estradiol serum yang bermakna secara statistik antara fase *bleeding* dan fase ovulasi ($p < 0,001$). Hasil perbandingan rerata kadar estradiol serum fase *bleeding* dan fase ovulasi dapat dilihat pada gambar 2.



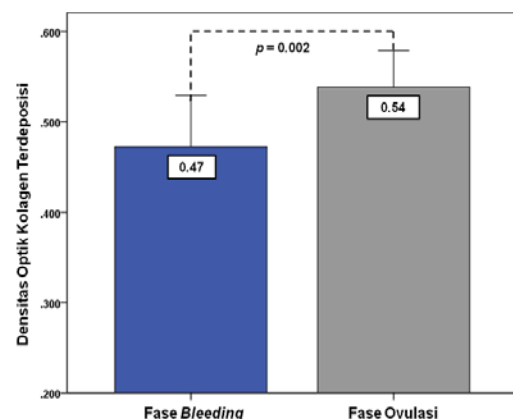
Gambar 2. Perbandingan rerata kadar estradiol serum fase *bleeding* dan fase ovulasi. Bermakna bila $p < 0,05$.

Rerata indeks proliferasi fibroblas yang dipajankan pada serum fase *bleeding* adalah $1,09 \pm 0,63$ sedangkan rerata indeks proliferasi fibroblas yang dipajankan pada serum fase ovulasi adalah $1,44 \pm 0,66$. Perbandingan rerata indeks proliferasi fibroblas yang terpajan dengan serum fase *bleeding* dan fase ovulasi menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik ($p = 0,007$). Hasil perbandingan rerata indeks proliferasi fibroblas yang terpajan serum fase *bleeding* dan fase ovulasi dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Perbandingan rerata indeks proliferasi fibroblas yang terpajan serum pada fase *bleeding* dan fase ovulasi. Bermakna bila $p < 0,05$.

Rerata densitas optik kolagen yang terdeposisi dari fibroblas yang terpajan serum pada fase *bleeding* adalah $0,47 \pm 0,2$, sedangkan rerata densitas optik kolagen non-solubel yang diproduksi oleh fibroblas yang terpajan serum pada fase ovulasi adalah $0,54 \pm 0,14$. Hasil analisis dengan uji Wilcoxon signed rank test menunjukkan perbedaan rerata densitas optik yang bermakna secara statistik ($p = 0,002$). Gambar 4 menunjukkan hasil perbandingan rerata densitas optik kolagen yang terdeposisi dari fibroblas yang terpajan serum pada fase *bleeding* dan fase ovulasi.



Gambar 4. Perbandingan rerata densitas optik kolagen non solubel dari fibroblas yang terpajan serum fase *bleeding* dan fase ovulasi. Bermakna bila $p < 0,05$.

DISKUSI

Pada penelitian ini rerata kadar estradiol serum fase ovulasi secara bermakna lebih tinggi dibandingkan dengan rerata kadar estradiol serum fase bleeding. Hal tersebut sesuai dengan teori yang menyebutkan bahwa selama fase bleeding siklus menstruasi, kadar estradiol berada pada kadar terendah, sementara kadar tertinggi ditemukan saat ovulasi.^{11,12} Hal ini disebabkan pada fase bleeding, korpus luteum meluruh dan tidak lagi menghasilkan estradiol dan progesteron, sementara pada fase pre-ovulasi folikel de Graaf memproduksi estradiol dalam jumlah banyak hingga terjadi ovulasi.^{11,13}

Penelitian ini adalah penelitian pertama yang membandingkan efek mitogenik antara serum fase bleeding dan fase ovulasi siklus menstruasi perempuan usia reproduktif dalam kaitannya dengan proses penyembuhan luka. Serum diketahui mengandung protein, misalnya albumin, imunoglobulin, transferin, haptoglobin, lipoprotein¹⁴, estradiol¹⁵, dan mengandung faktor pertumbuhan misalnya TGF- α , TGF- β , *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor* (IGF)-1, dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF).¹⁶ Diketahui pula bahwa estradiol dan faktor pertumbuhan dapat meningkatkan proliferasi sel dan aktivitas fibroblas dalam mensintesis matriks ekstraselular, sehingga berkontribusi dalam proses penyembuhan luka.^{17,18} Estradiol diketahui meningkatkan ekspresi reseptor TGF- β yang kemudian akan meningkatkan proliferasi fibroblas.^{19,20} Perempuan pasca menopause yang mengalami penurunan TGF- β dapat meningkatkan faktor pertumbuhannya dengan terapi sulih hormon.^{20,21}

Penelitian in vitro menggunakan fibroblas sebagai alat ukur menunjukkan bahwa serum, baik pada fase *bleeding* maupun fase ovulasi, dapat meningkatkan indeks proliferasi fibroblas, namun serum pada fase *bleeding* memiliki efek yang lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan serum pada fase ovulasi. Proliferasi fibroblas yang terpajan serum dapat terjadi karena serum mengandung faktor pertumbuhan. Proliferasi yang lebih rendah pada sel yang terpajan serum pada fase *bleeding* kemungkinan disebabkan kandungan kadar estradiol yang lebih rendah dibandingkan dengan serum fase ovulasi. Estradiol memiliki kemampuan meningkatkan proliferasi fibroblas dengan bekerja melalui reseptor estrogen (estrogen receptor) (ER)- α and ER- β .^{19,22} Ashcroft, dkk. (1999)²³ juga menemukan bahwa sekresi TGF- β 1 dari kultur fibroblas dermis dapat meningkat karena adanya 17 β -estradiol.²³ Transforming Growth Factor- β kemudian akan bekerja pada reseptornya di fibroblas dan meningkatkan proliferasi sel tersebut.^{18,24}

Estrogen topikal diketahui dapat mempercepat proses penyembuhan luka pada lansia dan orang muda melalui reepitelisasi, aktivitas TGF- β , dan deposisi kolagen^{5,25,26},

sementara rendahnya kadar estrogen pada perempuan pasca menopause menyebabkan penurunan jumlah kolagen pada kulit perempuan tersebut.^{17,21} Estrogen dapat meningkatkan kualitas kulit dengan mengurangi superoksida^{27,28}, mengubah respons inflamasi luka^{29,30}, dan meningkatkan ekspresi TGF- β sehingga meningkatkan sintesis kolagen.^{18,23}

Sintesis kolagen sebagai hasil aktivitas fibroblas pada penelitian ini dinilai dengan mengukur densitas optik kolagen yang terdeplesi yang dicat dengan siri-us red. Densitas optik kolagen ditemukan lebih rendah pada fibroblas yang dipajankan pada serum fase *bleeding* dibandingkan dengan fibroblas yang dipajankan pada serum fase ovulasi. Hasil tersebut dapat terjadi karena serum fase *bleeding* memiliki kadar estradiol yang lebih rendah dibandingkan dengan serum fase ovulasi, sehingga menyebabkan kadar TGF- β yang lebih rendah.

Transforming Growth Factor- β selain diketahui menstimulasi proliferasi fibroblas, ternyata diketahui dapat memicu sintesis matriks ekstraselular dan mengurangi ekspresi enzim proteolitik misalnya MMP-1.^{5,7,18} Son, dkk.(2005)¹⁸ menemukan peningkatan ekspresi prokolagen tipe I pada kulit lansia yang menggunakan estradiol topikal.¹⁸ Penghambatan enzim MMP-1 oleh hormon ini akan menurunkan degradasi kolagen dan kemudian akan meningkatkan jumlah kolagen yang terdeplesi.^{5,18} Kadar estradiol yang lebih rendah pada serum fase *bleeding* dapat menjelaskan hasil densitas optik yang merefleksikan kolagen yang terdeplesi, lebih rendah pada fibroblas yang terpajan serum fase bleeding dibandingkan dengan serum fase ovulasi.

SIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa serum fase *bleeding* memiliki kemampuan mitogenik yang lebih rendah dibandingkan dengan serum fase ovulasi. Kebijakan untuk tidak melakukan pembedahan elektif pada perempuan yang sedang menstruasi tidak hanya berhubungan dengan gangguan pembekuan darah pada lokasi luka, namun juga berhubungan dengan peran serum estradiol dalam proses penyembuhan luka.

DAFTAR PUSTAKA

- Kenig J, Richter P, Sikora Ł. Menstruation still a contraindication to elective surgery? *Pol Przegl Chir.* 2014;86:57-9.
- Sharief LA, Lawrie AS, Mackie IJ, Halimeh IJ, Kappert G, Smith C, dkk. Plasma factor XIII level variations during menstrual cycle. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2016;20:26:5.
- Hanci V, Ayoğlu H, Yilmaz M, Yurtlu S, Okyay RD, Erdoğan G, dkk. Effect of menstrual cycle on the injection pain due to propofol. *Eur J Anaesthesiol.* 2010;27:425-7.
- Rahimi M, Kalani P. The effects of the menstrual cycle on the hemodynamic response to laryngoscopy and tracheal intubation [abstract]. *Eur J Anaesthesiol.* 2014;31:55.
- Philips N, Devaney J. Beneficial regulation of type I collagen and matrix metalloproteinase-1 expression by estrogen, progesterone, and its combination in skin fibroblast. *J Am Aging Assoc.* 2003;26:59-62.
- Markiewicz M, Znoyko S, Stawski L, Ghatnekar A, Gilkeson G, Trojanowska M. A role for estrogen receptor- α and estrogen receptor- β in collagen biosynthesis in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 2013;133:120-7.
- Qu LD, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O. Effects of 17 β -estradiol on matrix metalloproteinase-1 synthesis by human dermal fibroblasts. *Maturitas.* 2006;54:39-46.
- Bottai G, Mancina R, Muratori M, Di Gennaro P, Lotti T. 17 β -estradiol protects human skin fibroblasts and keratinocytes against oxidative damage. *J Eur Acad Dermatol Venerol.* 2013;27:1236-43.
- James TJ, Hughes MA, Cherry GW, Taylor RP. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Repair Regen.* 2003;11:172-6.
- Wlaschek M, Scharfetter-Kochanek K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2005;13:452-61.
- Hall G, Phillips TJ. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:555-68.
- Stricker R, Eberhart R, Chevaillier MC, Quinn FA, Bischof P, Stricker R. 2006, Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbot ARCHITECT® analyzer. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44:883-7.
- Henriet P, Gaide Chevonnay HP, Marbaix E. The endocrine and paracrine control of menstruation. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;358:197-207.
- Adkins JN, Vamum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, dkk. Toward a human blood serum proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1:947-55.
- Dighe AS, Sluss PM. Improved detection of serum estradiol after sample extraction procedure. *Clin Chem.* 2004;50:764-6.
- Li Y, Fan J, Chen M, Woodley DT. Transforming growth factor- α : a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol.* 2006;126:2096-105.
- Brincat MP, Baron YM, Galea R. Estrogens and the skin. *Climacteric.* 2005;8:110-23.
- Son ED, Lee JY, Lee S, Kim SM, Lee BG, Chang IS, dkk. Topical application of 17 β -estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating TGF- β signaling in aged human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2005;124:1149-61.
- Stevenson S, Nelson LD, Sharpe DT. 17 β -estradiol regulates the secretion of TGF- β by cultured human dermal fibroblasts. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2008;19:1097-109.
- Thornton MJ. Estrogens and aging skin. *Dermato-Endocrinol.* 2013;5:264-70.
- Stevenson S, Thornton J. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs. *Clin Interv Aging.* 2007;2:283-97.
- Stevenson S, Nelson LD, Huq S, Sharpe DT, Thornton MJ. Oestrogens and wound healing: migration, proliferation and secretion of paracrine factors by human dermal fibroblasts in vitro [Online]. 2005 [cited August 2016]. Presented at 196th Meeting of the Society for Endocrinology and Society for Endocrinology joint Endocrinology and Diabetes Day. 2005, London, UK. Endocrine Abstracts 10 P80. Available from URL: <http://www.endocrine-abstracts.org/ea/0010/ea0010P80.htm>
- Ashcroft GS, Dodsworth J, van Boxtel E, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, dkk. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. *Nat Med.* 1997;3:1209-15.
- Lal BK, Saito S, Pappas PJ, Padberg PJ, Cerveira JJ, Hobson RW, dkk. Altered proliferative responses of dermal fibroblasts to TGF- β 1 may contribute to chronic venous stasis ulcer. *J Vasc Surg.* 2003;37:1285-93.
- Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MWJ. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged human associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol.* 1999;155:1137-46.
- Strudwick X, Powell BC, Cowin AJ. Role of sex hormones in acute and chronic wound healing. *Primary Intention.* 2006;14:35-8.
- Emmerson E, Hardman MJ. The role of estrogen deficiency in skin ageing and wound healing. *Biogerontology.* 2012;13:3-20.
- Velarde MC. Mitochondrial and sex steroid hormone crosstalk during aging. *Longev Healthspan.* 2014;3:2.
- Ashcroft GS, Mills SJ, Lei KJ, Gibbons L, Jeong MJ, Taniguchi M, dkk. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest.* 2003;111:1309-18.
- Hardman MJ, Ashcroft GS. Hormonal influences on wound healing: A review of current experimental data. *Wounds.* [Online]. 2005 [cited March 2016]. Available from URL: <http://www.woundsresearch.com/article/4908>.