

ФАРМАКОЛОГИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-8-17-21

ВЛИЯНИЕ ЭСТРИОЛА НА ОБМЕН КОЛЛАГЕНА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ВЛАГАЛИЩА ПОСЛЕ ПЛАСТИЧЕСКОЙ ОПЕРАЦИИ У ПАЦИЕНТОК ПОСЛЕРОДОВОГО ПЕРИОДА

Ю. Э. Доброхотова¹, Т. С. Нагиева¹, И. Ю. Ильина¹, Б. А. Слободянюк¹,
Е. В. Зрагус², Е. Н. Карева^{1, 4}, Н. А. Кочина¹, И. А. Шахмартова³,
Е. В. Краснощок¹, С. Ю. Шипилова⁴

В исследовании определено влияние локального применения эстриола на параметры обмена коллагена в ткани слизистой оболочки влагалища после пластической операции у пациенток послеродового периода с дисфункцией тазового дна. В исследование включены 18 пациенток с жалобами на начальные проявления дисфункции тазового дна. После операции — сайт-специфической пластики стенок влагалища по авторской методике (по поводу опущения стенок влагалища и несостоятельности мышц тазового дна) — пациенткам назначено применение вагинальных суппозиториев “Овестин” в дозе 0,5 мг эстриола 2 раза в неделю в течение 2 мес, начиная с 3 недели после операции. Сразу после завершения курса суппозиториев эстриола пациентки проходили повторную биопсию в амбулаторных условиях. Оценка параметров коллагенолиза проводили на основании уровня матричных РНК (мРНК) специфических белков соединительной ткани влагалища методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. В ходе исследования обнаружено статистически значимое увеличение уровней экспрессии генов металлопротеиназ 2 и 9, декорина, коллагенов 1A1 и 3A1. Параллельно выявлено компенсаторное увеличение экспрессии генов тканевых ингибиторов металлопротеиназ — TIMP1,2. Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии курсового локального применения эстриола на коллагенолиз в слизистой оболочке влагалища у пациенток после операции по поводу дисфункции тазового дна в послеродовом периоде.

Ключевые слова: дисфункция тазового дна; послеродовый период; эстриол; коллагены; декорин; металлопротеиназы.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из самых частых последствий родов через естественные родовые пути является утрата стенками влагалища физиологического тонуса — синдром вагинальной релаксации [16]. Это анатомическое изменение влечет за собой целый ряд последствий, начиная с диспареунии и аноргазмии [4] и заканчивая рецидивированием вагинального дисбиоза [7]. Аналогичные симптомы наблюдаются у женщин менопаузального периода (генитоуринарные расстройства). В последнем случае достаточно эффективным способом поддержки вагинальной состоятельности служит замести-

тельная гормональная терапия — локальное применение эстрогенов. Синдром вагинальной релаксации диагностируется во всех возрастных группах, и потому прямо не связан с гормональным статусом женщины. Применение эстрогенсодержащих препаратов с лечебной целью у пациенток без стероидного дефицита направлено на локальную поддержку метаболизма ткани влагалища. Особого внимания заслуживает положительный клинический опыт применения эстриола после оперативного реконструктивного вмешательства. При этом в литературе практически отсутствуют данные о механизмах метаболических эффектов препаратов эстриола на слизистую влагалища у пациенток детородного возраста.

Структурным компонентом межклеточного матрикса (МКМ) являются коллагеновые волокна. Основная функция коллагена заключается в том, чтобы поддерживать специфическую структуру органов и тканей. Способность коллагена упорядочивать и стабилизировать матрикс определяется тем, что он сам строго упорядочен и стабилен [5]. Коллагеновые волокна прида-

¹ ФГБУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава РФ, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1.

² Родильный дом № 1 (ГКБ № 67 имени Л. А. Ворохобова, филиал), Россия, 125480, Москва, ул. Вилуса Лациса, 4.

³ Клинико-диагностический центр “МЕДСИ-2”, Россия, 123242, Москва, ул. Красная Пресня, 16.

⁴ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

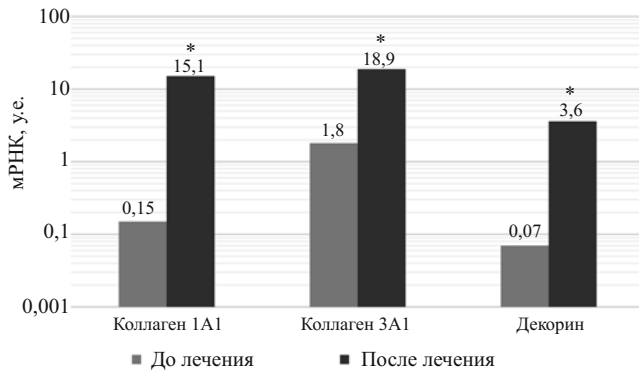


Рис. 1. Уровень мРНК коллагена 1A1 и 3A1 типов, декорина в ткани влагалища пациенток до и после лечения эстриолом (у.е. = $\lg[100 \cdot (1/2)^{\Delta Ct}]$ vs GAPDH).

* Статистически достоверная разница с показателем до лечения при $p \leq 0,0001$ (критерий Манна — Уитни).

ют соединительной ткани прочность и долговечность. Из всего многообразия типов коллагена в структуре урогенитального тракта преобладают I и III типы [6, 9]. Коллаген I типа самый прочный. Уровень коллагена 1-го типа снижается в МКМ после 30 лет и постепенно замещается коллагенами III и IV типов, которые являются менее прочными [11]. В норме коллаген характеризуется относительно низкой интенсивностью обмена. Период полураспада различных типов коллагена колеблется от нескольких дней до года [6]. Помимо ферментов обмена коллагена, принципиальное значение в посттрансляционной модификации белка и укладке регулярных макромолекул в макрокомплексы имеет ряд протеинов/протеогликанов, среди которых особое место принадлежит декорину. Доказана его регуляторная роль в процессах формирования и восстановления коллагена в МКМ. Ранее нами получены данные о различиях в уровне экспрессии генов коллагенов I и III типов, металлопротеиназ и протеогликанов при инконтиненции и пролапсе органов малого таза (ОМТ) [8]. На более высоком уровне контролирует обмен белков МКМ эндокринная система, и в первую очередь — стероидные гормоны. Так как половые

гормоны влияют на синтез и распад коллагена в органах-мишенях [1, 14], не удивительно, что гормональная терапия с успехом применяется для коррекции урогенитальных расстройств. Эстрогены повышают, а дефицит эстрогенов в постменопаузе снижает образование коллагена в соединительной ткани [2]. При этом данные о влиянии локального применения эстриола на основные показатели коллагеногенеза слизистой оболочки влагалища у пациенток детородного возраста в доступной литературе отсутствуют.

Целью нашего исследования стало определение влияния курсового применения препарата эстриола (суппозитории с эстриолом интравагинально 0,5 мг 2 раза в неделю в течение 2 мес, начиная с 3 недели с момента операции) на коллагеногенез — уровень мРНК коллагенов 1A1 и 3A1, металлопротеиназ (metalloproteinase — MMP-2, MMP-9), тканевых ингибиторов металлопротеиназ (tissue inhibitor of metalloproteinase) TIMP-1 и -2, декорина в ткани влагалища у пациенток в послеродовом периоде с проявлениями дисфункции тазового дна после оперативной реконструкции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего в исследовании приняли участие 18 пациенток с жалобами на начальные проявления дисфункции тазового дна (ДТД), сохраняющиеся спустя 2 мес после вагинальных родов. Исследование проводили на базе роддома № 1 и отделения женского здоровья клинико-диагностического центра “Медси”. Лечение пациенток включало 2 этапа: 1) сайт-специфическая пластика стенок влагалища по авторской методике (по поводу опущения стенок влагалища и несостоятельности мышц тазового дна) [10]; 2) курсовое применение эстрогена интравагинально. Пациенткам было показано применение вагинальных суппозитивов эстриол в дозе 0,5 мг × 2 раза в неделю в течение 2 мес, начиная с 3 недели после операции. Цель назначения эстроген-содержащих свечей — стимуляция процессов регенерации слизистой влагалища после пластической операции. Раз в месяц проводили УЗИ контроль за со-

Нуклеотидная последовательность праймеров

| Праймер | Нуклеотидная последовательность |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>GAPDH forward</i> | CTC AAC GAC CAC TTT GTC AAG CTC A |
| <i>GAPDH reverse</i> | GGT CTT ACT CCT TGG AGG CCA TGT G |
| <i>Decorin forward</i> | GGA CCG TTT CAA CAG AGA GG |
| <i>Decorin reverse</i> | GAG TTG TGT CAG GGG GAA GA |
| <i>MMP-9 forward</i> | AGA TGT GGG TGT ACA CAG GC |
| <i>MMP-9 reverse</i> | TTC ACC CGG TTG TGG AAA CT |
| <i>Collagen type 3A1 forward</i> | TGG CTA CTT CTC GCT CTG CTT |
| <i>Collagen type 3A1 reverse</i> | CGG ATC CTG AGT CAC AGA CAC A |
| <i>MMP-2 forward</i> | ACC ACA GCC AAC TAC GAT GAC |
| <i>MMP-2 reverse</i> | GGT CTT GGG AGT GCT CCA G |
| <i>Collagen type 1A1 forward</i> | AGG GCC AAG ACG AAG ACA TC |
| <i>Collagen type 1A1 reverse</i> | AGA TCA CGT CAT CGC ACA ACA |

стоянием эндометрия (патологии не выявлено). Сразу после завершения курса суппозиториев с эстриолом пациенткам проводили повторную биопсию в амбулаторных условиях (первичная биопсия получена в ходе операции). Методы диагностики включали сбор анамнеза, объективный осмотр, оценку состояния промежности и вульвы при визуальном осмотре; стандартные клинико-лабораторные исследования. Средний возраст пациенток составил $(38,4 \pm 4,5)$ лет. Критериями включения явились: желание пациентки участвовать в исследовании; наличие симптомов ДТД и релаксированного влагалища, роды через естественные родовые пути, подписанное информированное согласие на участие. В качестве критериев исключения фигурировали: беременность, пролапс гениталий по POP-Q III и выше стадии; тяжелая экстрагенитальная патология, аномалии развития мочеполовой системы, миома матки больших размеров, субмукозная миома матки, дисплазия шейки матки, объемные образования органов малого таза, операции на органах малого таза в анамнезе, острые воспалительные заболевания органов малого таза и урогенитального тракта; онкологические заболевания; заболевания кожи в активной фазе; заболевания, передаваемые половым путем. На проведение исследования получено разрешение локального этического комитета РНИМУ имени Н. И. Пирогова.

Анализ интенсивности обмена коллагенов осуществляли на основании оценки уровня матричной РНК (мРНК) коллагенов 1 (Collagen 1A1) и 3 типа (Collagen 3A1), декорина (Decorin), матричных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-9) и их тканевых ингибиторов (TIMP-1, TIMP-2). С помощью скальпеля производили биопсию задней стенки влагалища (до и после лечения). Размеры образца составили около $0,3 \times 0,3$ см. Полученный материал помещали в пробирку типа “эппендорф” с раствором IntactRNA (EVROGEN) и хранили при температуре -20°C . Выделение мРНК из ткани влагалища осуществляли при помощи набора “АмплиПрайм РИБО-преп” в соответствии с инструкцией производителя. Получение кДНК на матрице мРНК проводили с использованием комплекта готовых реагентов “Реверта-L” в соответствии с официальной инструкцией. Для полимеразной цепной реакции использовали набор реактивов для ПЦР “Реакционная смесь 2,5x для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени” (PCR-RT) в присутствии SYBR Green 1” на приборе iCycler iQ5 real-time PCR (BioRad, Германия).

Значения экспрессии каждого из целевых генов нормировали по уровню экспрессии гена, кодирующего глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (GAPDH). Праймеры и программы амплификации “СИНТОЛ”, Москва.

Для оценки количества копий мРНК применяли $\Delta\Delta\text{Ct}$ -метод относительного определения количества по формуле $(1/2)^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ (y.e.), где $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$ (изучаемого гена) $- \text{Ct}(\text{GAPDH})$, и $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$, где

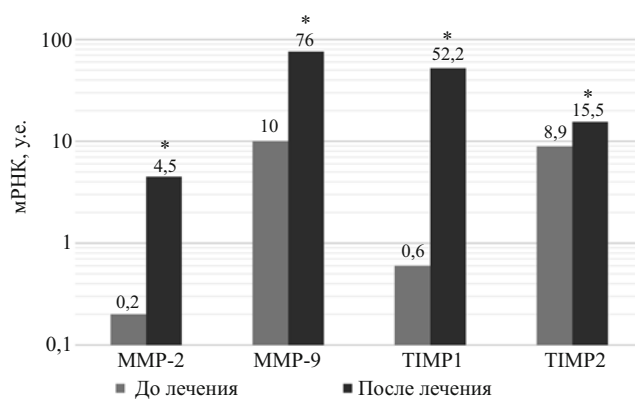


Рис. 2. Уровень мРНК матричных металлопротеиназ 2 и 9, а также их ингибиторов TIMP 1 и 2 в ткани влагалища пациенток до и после лечения эстриолом (y.e. = $\lg[100 \cdot (1/2)^{\Delta\Delta\text{Ct}}]$ vs GAPDH).

MMP-2 и -9 — металлопротеиназы 2 и 9, TIMP-1 и -2 — тканевые ингибиторы металлопротеиназ.

* Статистически достоверная разница с показателем до лечения при $p \leq 0,05$ (критерий Манна — Уитни).

$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ (образец ткани, полученный после курса терапии) $- \Delta\text{Ct}$ (образец, взятый до начала терапии).

Обработку результатов проводили с использованием статистической программы GraphPad Prism 5. Достоверность различий между группами по изучаемым параметрам оценивали с помощью непараметрических критериев статистики (Фишера, Манна – Уитни). Для оценки взаимосвязи количественных признаков был использован критерий ранговой корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование экспрессии генов белков коллагенового обмена ткани влагалища до и после окончания курса локального лечения эстриолом продемонстрировало следующие результаты.

Уровень мРНК коллагенов обоих изученных типов в транскриптоме слизистой оболочки влагалища увеличился после курса гормонального лечения (рис. 1).

Известно, что механическая прочность поддерживающего аппарата ткани зависит от количества и качества коллагеновых волокон. Из всего многообразия типов коллагенов III и I типы являются главными составляющими волокнистой соединительной ткани урогенитального тракта [18], отвечают за её растяжимость и плотность [17]. По некоторым данным, коллаген III типа в соединительной ткани отвечает за растяжимость, а коллаген I типа обуславливает механическую прочность ткани. Доказано участие интенсивного распада коллагенов и их дисбаланса со снижением упругости и прочности парауретральной ткани в развитии пролапса органов малого таза [3].

Соединительная ткань непрерывно обновляется, подвергается перестройке в ответ на нагрузку и повреждение [11]. Состояние коллагеновых фибрилл, ин-

тенсивность их биосинтеза фибробластами зависят от многих факторов (наследственные, гормональные). Количество эстрогеновых рецепторов в клетках вагинального эпителия колеблется в течение менструального цикла, тогда как в соединительной ткани содержание эстрогеновых рецепторов постоянно высокое, поэтому коллаген, входящий в состав соединительной ткани влагалищной стенки, является эстрогенчувствительной структурой [13]. Коллаген имеет длительный период полужизни и с течением времени гликируется. Концентрация продуктов гликирования является индикатором зрелости ткани. На фоне терапии эстрогенами у пациенток постменопаузального возраста наблюдается снижение уровня продуктов гликирования, что поддерживает гипотезу повышенного обновления коллагена. Однако, по некоторым данным [15], общее содержание коллагена в МКМ на фоне эстрогенотерапии может не повышаться. Приведенные сведения касаются женщин в постменопаузе разной глубины. У женщин детородного возраста таких исследований не проводилось, так как основная цель локального применения эстриола в этом случае не заместительная терапия, а интенсификация метаболизма/репарации ткани. В нашем исследовании получено стабильное повышение уровня экспрессии обоих типов коллагенов с разной степенью выраженности. Экспрессия гена коллагена 1A1 увеличилась в среднем в 410 раз, а коллагена 3A1 в 56 раз, по сравнению с фоновыми значениями.

Анализ экспрессии гена белка регулятора коллагеногенеза — декорина — показал, что уровень мРНК декорина в ткани влагалища после лечения эстриолом увеличен в 119 раз (рис. 1) и составил $(0,07 \pm 0,04)$ и $(3,6 \pm 1,0)$ у.е. до и после лечения, соответственно ($p \leq 0,0001$).

Декорин определяет механическую прочность коллагенового волокна, способствуя продольной ориентации фибрилл с их жесткой фиксацией. Ранее нами была найдена положительная корреляционная связь между уровнями экспрессии генов декорина и коллагена I типа ($r = 0,81$; $p = 0,034$) [8]. Повышение транскрипции его гена может отражать общую интенсификацию коллагеногенеза.

Важным параметром в оценке функционального состояния МКМ является экспрессия ферментов катаболизма структурных элементов — металлопротеиназ. Протеолиз коллагена I и III типов зависит от активности MMP-2 и MMP-9. На рис. 2 приведены значения относительной экспрессии MMP и их эндогенных антагонистов в ткани влагалища у пациенток до и после гормонального лечения. Зарегистрировано статистически значимое повышение экспрессии генов обеих металлопротеиназ.

Интенсификация экспрессии генов ферментов и их антагонистов выражена в разной степени: MMP-2 больше в биоптатах слизистой у пациенток после лечения эстриолом, по сравнению с данными до лечения, в среднем в 64 раза, MMP-9 — в 18 раз, TIMP-1

— в 91 раз ($p < 0,001$). Уровень экспрессии TIMP-2 не изменился.

Несмотря на то, что MMP-9 и -2 имеют сходное строение и субстраты, существует ряд особенностей. Так, MMP-2 синтезируется конституитивно мезенхимальными клетками (фибробласты, макрофаги, эндотелиальные и эпителиальные клетки), а MMP-9 является продуктом провоспалительных клеток (моноциты, макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы) [12]. Доминирование уровня мРНК MMP-2 над MMP-9 может свидетельствовать о преобладании процессов синтеза коллагена над процессами распада. Поскольку MMP-9 в основном, является маркером воспалительного процесса, неудивительно, что более значимый эффект эстриол оказал на MMP-2, фермент, отражающий обновление/ремоделирование ткани. Аналогичная ситуация наблюдалась с эндогенными антагонистами. Замещение старого коллагена новым сопровождается увеличением числа сшивок и может приводить к упрочнению ткани [15].

Очевидно, что небольшая выборка (количество исследуемых пациентов) ограничивает статистическую мощность полученных результатов. Однако уже на данном этапе становится очевидным, что у пациенток репродуктивного возраста локальное применение эстриола интенсифицирует процессы коллагенеза с образованием нового белка. Требуется дальнейшее сравнительное изучение экспрессии белков коллагенового метаболизма в соединительной ткани вульво-вагинальной области и белков маркеров пролиферации фибробластов для определения их роли в клиническом эффекте гормональной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, эстриол (“Овестин” суппозитории 0,5 мг 2 раза в неделю интравагинально в течение 2 мес, начиная с 3 недели после операции) интенсифицирует обмен коллагена в ткани влагалища у пациенток послеродового периода с проявлениями ДТД после оперативной реконструкции с преобладанием процессов коллагеногенеза: повышает уровень мРНК коллагенов I и III типов в 410 и 56 раз, декорина — в 119 раз, MMP-2 и -9 — в 64 и 18 раз, TIMP-1 — в 91 раза ($p \leq 0,001$). Активация коллагенеза ассоциирована с репаративной эффективностью гормональной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Е. Балан, Л. А. Ковалева, *Гинекология*, **11**(6), 23 – 25 (2009).
2. Ю. Э. Доброхотова, *Менопаузальный синдром*, РГМУ, Москва (2005), сс. 2 – 24.
3. Ю. Э. Доброхотова, И. Ю. Ильина, М. С. Жданова, *Рос. вестник акушера-гинекол.*, № 4, 15 – 18 (2009).
4. Ю. Э. Доброхотова, Т. С. Нагиева, Б. А. Слободянюк, *Рос. мед. ж. Мать и дитя*, № 2, 112 – 118 (2018).

5. Н. Н. Зайко, Г. М. Бутенко, Ю. В. Быць, В. А. Горбань и др., *Патологическая физиология*, АОЗТ Эссен, Элиста (1994), сс. 132 – 146.
6. И. Ю. Ильина, С. В. Юмина, М. С. Жданова, *Вестник Рос. универ. дружбы народов, Сер.: Мед.*, № 5, 207 – 214 (2009).
7. И. В. Краснополянская, *Акушерство и гинекол.*, № 2, 82 – 86 (2018).
8. И. В. Краснополянская, А. А. Попов, Н. В. Горина и др., *Рос. вестник акушера-гинекол.*, **15**(6), 36 – 41 (2015).
9. С. Б. Маличенко, В. А. Волкова, К. К. Халидова, *Consil. Med.*, № 12, 9 – 18 (2007).
10. О. Ю. Павленко, Д. М. Ибрагимова, Ю. Э. Доброхотова, *Инъекционные методы в косметол.*, № 1, 62 – 74 (2016).
11. В. Е. Радзинский, *Перинеология*, Медицинское информационное агентство, Москва (2006), сс. 14 – 91.
12. Т. Ю. Смольнова, *Дис. ... канд. мед. наук*, Москва (2009).
13. Е. В. Тихомирова, *Consil. Med.*, № 6, 8 – 12 (2006).
14. И. Г. Шестакова, *Гинекология*, **12**(1), 10 – 13 (2010).
15. S. Jackson, M. James, P. Abrams, *Br. J. Obstet. Gyn.*, **109**(3), 339 – 344 (2002).
16. Y. Sekiguchi, Y. Utsugisawa, Y. Azekosi, et al., *J. Womens Health (Larchmt)*, **22**(9), 775 – 781 (2013); doi: 10.1089 / jwh.2012.4123.
17. E. Trabucco, M. Soderberg, L. Cobellis, et al., *Maturitas Eur. Menopause J.*, **58**(4), 395 – 405 (2007).
18. Y. Wen, Y. Zhao Y., S. Li, *Human Reproduction*, **22**(6), 1718 – 1724 (2007).

Поступила 02.08.19

ESTRIOL EFFECT ON VAGINAL MUCOSA COLLAGEN TURNOVER IN POSTPARTUM WOMEN AFTER PLASTIC SURGERY

Yu. E. Dobrokhotova¹, T. S. Nagieva¹, I. Yu. Il'ina¹, B. A. Slobodyanyuk¹, E. V. Zraguz², E. N. Kareva^{1,4*}, N. A. Kochina¹, I. A. Shakhmartova³, E. V. Krasnoshchok¹, and S. Yu. Shipilova⁴

¹ N. I. Pirogov Russian State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997, Russia

² Maternity House No. 1 (Clinical Hospital No. 67), ul. Vilisa Lacisa 4, Moscow, 125480 Russia

³ MEDSI-2 Clinical Diagnostic Center, ul. Krasnaya Presnya 16, Moscow, 123242 Russia

⁴ Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

* e-mail: elenakareva@mail.ru

The effect of local estriol administration on collagen turnover parameters in vaginal tissues of postpartum women with pelvic diaphragm dysfunction was studied in a group of 18 patients with early pelvic diaphragm disfunction symptoms. After having site-specific plastic surgery of vagina wall by a proprietary method (regarding colpocele and pelvic diaphragm failure), “Ovestin” vaginal suppositories with estriol dose 0.5 mg was prescribed to the patients for 2 months twice a week starting from the third week after surgery. Patients underwent a second biopsy at outpatient department immediately after the full course of “Ovestin” suppositories. Collagenogenesis parameters were evaluated based on the vaginal connective tissue-specific mRNA expression levels as measured online by RT-PCR. During the study, a statistically significant increase in expression levels of MMP-2, MMP-9, decorin, and collagen 1A1 and 3A1 genes was found. At the same time, a compensatory increase in the expression levels of tissue metalloproteinase inhibitors TIMP1,2 genes was observed. These data are indicative of the positive effect of local estriol administration on collagenogenesis in vaginal mucosa of postpartum women after having surgery regarding pelvic diaphragm dysfunction.

Keywords: pelvic floor dysfunction; postpartum period; estriol; collagens; decorin; metalloproteinases.