Wpływ estrogenów na stężenie *N*-terminalnego propeptydu kolagenu typu I w płynie uzyskanym z przestrzennych hodowli ludzkich fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej prowadzonych na siatkach polipropylenowych stosowanych w uroginekologii operacyjnej

Oestrogen treatment and N-terminal propeptide of type I collagen concentration in culture media of human pubo-cervical fascia fibroblasts surrounding polypropylene mesh used in urogynaecological surgery procedures

Jacek Tomaszewski[1], Aneta Adamiak-Godlewska[1], Michał Bogusiewicz[1], Wojciech Brzana[2], Małgorzata Juszczak[2], Wojciech Rzeski[2,3], Tomasz Rechberger[1]

[1]II Katedra i Klinika Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie; kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Rechberger
[2]Zakład Biologii Medycznej, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie
[3]Zakład Wirusologii i Immunologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Przegląd Menopauzalny 2010; 1: 5–12

Streszczenie

Wstęp: Dolegliwości związane z nietrzymaniem moczu lub defektem statyki narządu płciowego są jedną z częstszych przyczyn zgłaszania się kobiet do leczenia operacyjnego. Nowoczesne techniki zabiegowe w uroginekologii oparte są na implantacji syntetycznych taśm/siatek polipropylenowych mających wzmocnić uszkodzone struktury łącznotkankowe dna miednicy. Wybór właściwego graftu syntetycznego, prawidłowa technika operacyjna oraz właściwe leczenie w okresie rehabilitacji pooperacyjnej mają decydujące znaczenie dla uzyskania trwałego efektu leczniczego i zapobiegania powikłaniom o charakterze erozji czy też odrzutu taśmy/siatki. Rola estrogenów w procesach gojenia rany pooperacyjnej pochwy po zabiegach z implantacją siatek polipropylenowych jest nie do końca poznana. Niejednoznaczne i często sprzeczne informacje dotyczą wpływu estrogenoterapii na metabolizm kolagenu w tkance łącznej narządu płciowego.

Wyniki: Wykazaliśmy zdolność fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej kobiety do biosyntezy kolagenu typu I w hodowlach prowadzonych na mono- i multifilamentowych siatkach polipropylenowych. W przypadku słabych estrogenów (estriol, daidzeina) stężenie *N*-terminalnego propeptydu kolagenu typu I w medium wzrastało przez cały okres trwania eksperymentu, ale tylko w hodowlach prowadzonych na siatkach monofilamentowych. Estriol i daidzeina stymulowały biosyntezę kolagenu typu I silniej niż 17β-estradiol. Dotyczyło to zarówno hodowli prowadzonych na siatkach mono-, jak i multifilamentowych. Całkowita produkcja *N*-terminalnego propeptydu kolagenu typu I była wyższa w hodowlach prowadzonych na siatkach monofilamentowych suplementowanych estriolem i daidzeiną.

Wnioski: Uzyskane wyniki badań wskazują na potrzebę zastosowania estrogenów w okresie rehabilitacji pooperacyjnej u kobiet po menopauzie leczonych operacyjnie z powodu schorzeń uroginekologicznych.

Słowa kluczowe: wysiłkowe nietrzymanie moczu, fibroblasty, biosynteza kolagenu

Summary

Objectives: Polypropylene meshes are widely used for surgical treatment of stress urinary incontinence (SUI) and pelvic organ prolapse (POP). Synthesis and deposition of collagen induced by an inserted implant are largely controlled by oestrogens. The aim of the study was to assess the rate of collagen type I (Col I) synthesis by pubo-cervical fascia (PCF) fibroblasts cultured with mono- or multifilament polypropylene meshes in the presence of oestrogens.

Material and Methods: Specimens of PCF were obtained during a surgical procedure from a 56-year-old woman suffering from SUI and POP. Fibroblasts were cultured with mono- or multifilament meshes and exposed to 17β-oestradiol, oestriol or phytoestrogen daidzein. The cultures were run for 216 hrs and the media were repla-

Adres do korespondencji:
dr med. **Jacek Tomaszewski**, II Katedra i Klinika Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, SPSK4, ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin, tel. +48 81 72 44 686

ced every 72 hrs. Procollagen type 1 *N*-terminal propeptide (PINP), a marker of Col I biosynthesis, was assessed in culture media by radioimmunoassay.

Results: The biosynthesis of Col I was more abundant in the presence of monofilament than multifilament meshes. Fibroblasts exposed to oestriol or daidzein produced more Col I than those treated with oestradiol, regardless of the mesh applied. In the presence of monofilament mesh the rate of Col I synthesis induced by oestriol and daidzein increased persistently until the end of the experiment, whereas the peak concentration of PINP in cultures treated with oestradiol was observed between 72 hrs and 144 hrs. In the presence of multifilament mesh the rate of Col I production dropped after 144 hrs in all cultures.

Conclusions: PCF fibroblasts produce more Col I when cultured on monofilament than on multifilament mesh. This process may be enhanced by oestriol and phytoestrogens.

Key words: stress urinary incontinence, fibroblasts, collagen biosynthesis

Wstęp

Przewlekły niedobór estrogenów odpowiada za szereg uciążliwych dolegliwości zgłaszanych przez kobiety w okresie menopauzy. Dotyczy to zarówno objawów wczesnych, głównie neurowegetatywnych, jak i późnych, związanych z odległymi skutkami, jakie niosą mniej lub bardziej nasilone następstwa hipoestrogenizmu – zmianami zanikowymi w obrębie narządu płciowego czy nawracającymi infekcjami dróg moczowych. Konsekwencją przewlekłego niedoboru estrogenów jest deficyt kolagenu w łącznotkankowo-mięśniowym aparacie zawieszającym narząd płciowy kobiety oraz tkance łącznej okołocewkowej, co prowadzi do wystąpienia dolegliwości na tle zaburzeń statyki narządu płciowego (*pelvic organ prolapse* – POP) i/lub nietrzymania moczu (NM) [1–7].

Dolegliwości związane z NM/POP są jedną z częstszych przyczyn zgłaszania się kobiet do leczenia zabiegowego. Ocenia się, że w ciągu najbliższych 30 lat odsetek kobiet leczonych z powodu NM/POP wzrośnie o 45%, proporcjonalnie do wzrostu liczby kobiet, które ukończyły 50. rok życia. Odsetek pacjentek operowanych z powodu NM/POP rośnie od 3. dekady życia (0,96/1000 kobiet) i osiąga szczyt u kobiet będących w wieku 60–64 lat (5,24/1000 kobiet). Ryzyko, że w ciągu swojego życia kobieta, która dożyła 80 lat, zostanie poddana zabiegowi chirurgicznemu z powodu NM/POP, wynosi 7–11,1% [8–11].

Polipropylenowe siatki/taśmy mono- lub multifilamentowe są powszechnie stosowane w uroginekologii operacyjnej od lat 90. XX wieku. Techniki zabiegowe oparte na implantacji graftów syntetycznych pozwalają uzyskać długotrwały sukces terapeutyczny zarówno u pacjentek cierpiących na wysiłkową lub mieszaną postać NM, jak i u kobiet z zaawansowanym klinicznie defektem statyki narządu płciowego, chociaż nie jest do końca ustalone, czy powinno to być leczenie pierwszorzutowe, czy też syntetyczne protezy należy stosować jedynie u pacjentek z chorobą nawrotową [12–16].

Na rynku materiałów chirurgicznych stosowanych w zabiegach uroginekologicznych dostępne są implanty o różnych właściwościach strukturalnych, co potencjalnie może mieć wpływ na ich zastosowanie w praktyce klinicznej. Wybór właściwego graftu syntetycznego, obok prawidłowej techniki operacyjnej, ma kluczowe znaczenie dla uzyskania trwałego efektu leczniczego i zapobiegania powikłaniom o charakterze erozji lub odrzutu taśmy/siatki [15–20].

Estrogeny podawane systemowo/miejscowo mogą regulować metabolizm kolagenu w komórkach tkanki łącznej układu zawieszająco-podpierającego narząd płciowy, odpowiadając m.in. za zwiększenie zawartości kolagenu włókienkowego, białek macierzy pozakomórkowej w tkance łącznej okołocewkowej czy ekspresję cystatyny C w fibroblastach oraz komórkach mięśniowych gładkich pochwy – białka będącego inhibitorem proteinazy cysteinowej, enzymu odgrywającego istotną rolę w przebudowie macierzy pozakomórkowej. Duże stężenie cystatyny C zwiększa wytrzymałość biomechaniczną pochwy i może opóźniać wystąpienie lub łagodzić stopień nasilenia zaburzeń statyki pochwy i podparcia cewki moczowej. Estrogeny poprzez wpływ na aktywność kolagenolityczną komórek tkanki łącznej biorą udział w procesie gojenia rany pooperacyjnej. Steroidy te zmniejszają aktywność kolagenolityczną metaloproteinaz oraz stymulują biosyntezę tkankowych inhibitorów metaloproteinaz, przez co zwiększają obrót metaboliczny kolagenu w obrębie miednicy mniejszej. Utracie „starego" kolagenu towarzyszy wzrost biosyntezy „młodego" kolagenu mierzony zwiększeniem stężenia niedojrzałych wiązań krzyżowych kolagenu – hydroksylizynonorluecynowych oraz hydroksylizynoketonorleucynowych. Wykazano zmniejszenie całkowitej zawartości kolagenu typu I w stosunku do kolagenu typu III i V aż o 75% w tkance łącznej łuku ścięgnistego powięzi miednicznej, ale tylko u kobiet niestosujących terapii hormonalnej. Estradiol stymulował u naczelnych ekspresję mRNA dla I i III typu kolagenu w łącznotkankowym aparacie zawieszającym narząd płciowy. Wykazano, że estrogeny optymalizują proces gojenia się rany pooperacyjnej, hamując migrację oraz uwalnianie przez granulocyty obojętnochłonne/makrofagi cytokin o działaniu prozapalnym (czynnik hamujący migrację makrofagów – MIF; czynnik martwicy guza α – TNF-α) i elastazy – enzymu degradującego białka macierzy pozakomórkowej. Z drugiej strony, estrogeny powodują

wzrost zawartość kolagenu typu I w skórze, co zwiększa wytrzymałość biomechaniczną rany pooperacyjnej. Estradiol stymuluje biosyntezę transformującego czynnika wzrostu, czynnika wzrostu fibroblastów oraz płytkowego czynnika wzrostu przez monocyty i makrofagi. Białka te są uznanymi czynnikami mitogennymi dla fibroblastów i stymulują ich proliferację, migrację oraz biosyntezę białek macierzy pozakomórkowej. Proces ten odpowiada za wytworzenie ziarniny i zamykanie się brzegów rany [21–36].

Optymalizacja postępowania medycznego i właściwe przygotowanie przedoperacyjne oraz postępowanie pooperacyjne, zarówno wczesne, jak i późne, może przynieść wymierne korzyści dotyczące zmniejszenia liczby powikłań związanych z nietolerancją lub odrzutem siatki wszczepianej do struktur miednicy mniejszej. Dobra stabilizacja implantu we wczesnym okresie rehabilitacji pooperacyjnej zmniejsza ryzyko nawrotu NM/POP lub wystąpienia erozji, a właściwe przerastania graftu przez tkankę łączną zwiększa wytrzymałość wytworzonej chirurgicznie struktury zabezpieczającej statykę narządu płciowego. Pozwala to uzyskać trwały efekt terapeutyczny zastosowanego leczenia operacyjnego.

Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu estrogenów (17β-estradiolu, estriolu, daidzeiny) na biosyntezę kolagenu typu I przez fibroblasty powięzi łonowo-cewkowej w hodowlach prowadzonych na siatkach polipropylenowych o różnych charakterystykach dotyczących architektury i struktury implantu.

Materiał i metody

Wyprowadzenie linii komórkowej V-31

Fragment powięzi łonowo-cewkowej o wymiarach 0,5 × 0,5 cm pobrano od 52-letniej miesiączkującej kobiety operowanej z powodu wysiłkowej postaci NM i zaburzenia statyki narządu płciowego w stopniu POPQ IIA/IP. Uzyskaną tkankę natychmiast umieszczono w buforze fosforanowym (PBS) suplementowanym jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} oraz antybiotykami – penicyliną (100 j/ml) i streptomycyną (100 µg/ml). Tkankę powięzi łonowo-cewkowej rozdrobniono mechanicznie nożem chirurgicznym, a uzyskane skrawki zawieszono w podłożu hodowlanym (DMEM D5921, Sigma) z dodatkiem 10-procentowej płodowej surowicy cielęcej (FBS) (F9665, Sigma). Fibroblasty namnażano w butelkach umieszczanych w inkubatorze zapewniającym stabilną temperaturę (37°C) oraz wilgotną atmosferę składającą się z 95% powietrza i 5% CO_2. Hodowlę prowadzono aż do całkowitego pokrycia powierzchni butelki hodowlanej przez namnażające się fibroblasty. Tak otrzymane komórki linii V-31 zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w banku hodowli.

Przygotowywanie hodowli fibroblastów do eksperymentu z użyciem siatek polipropylenowych

Komórki linii V-31 przechowywane w ciekłym azocie w banku hodowli rozmrażano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Następnie zawiesinę komórek przenoszono do plastikowych butelek hodowlanych z podłożem hodowlanym podgrzanym do temp. 37°C. Komórki inkubowano w inkubatorze w temperaturze 37°C z przepływem 5-proc. CO_2. Następnego dnia zmieniano podłoże na świeże w celu usunięcia toksycznego dimetylosulfotlenku (DMSO). Komórki hodowano aż do uzyskania jednolitej warstwy (*monolayer*). Po namnożeniu komórek hodowlę płukano PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} i poddawano działaniu 0,25-proc. trypsyny i kwasu etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) w celu otrzymania zawiesiny komórek potrzebnej do założenia eksperymentu.

Przestrzenne hodowle fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej na taśmach polipropylenowych

Taśmy polipropylenowe cięto na okrągłe fragmenty o średnicy 1,5 cm w sterylnych warunkach. Do eksperymentu użyto siatek:

- SPMM-149: siatka monofilamentowa, polipropylenowa AUTOSUTURE SURGIPROMESH (Covidien Polska),
- SPM-149: siatka multifilamentowa, polipropylenowa AUTOSUTURE SURGIPROMESH (Covidien Polska).

Szczegółowe parametry użytych siatek przedstawiono w tabeli I.

Przed założeniem hodowli fragmenty taśm poddawano stabilizacji w podłożu hodowlanym z dodatkiem 10-proc. FBS w temperaturze 37°C przez 2 dni. Tak przygotowane fragmenty taśm przyklejano do dna płytki hodowlanej (płytki 24-dołkowe, NUNC) przy użyciu jałowego smaru silikonowego lub przytwierdzano sterylnym plastikowym zaciskiem pierścieniowym. Dołki z taśmami dwukrotnie inokulowano hodowlą fibroblastów

Tab. I. Parametry siatek SURGIMESH SPMM-149 oraz SPM-149 użytych w doświadczeniu

	Typ siatki	Gramatura (g/m²)	Średnica oczek (mm)	Grubość siatki (mm)	Metoda sterylizacji
SPMM-149	monofilament	96	0,38 × 0,38	0,54	tlenek etylenu
SPM-149	multifilament	85	0,29 × 0,29	0,54	tlenek etylenu

w ilości 1 × 10^6 w dniu rozpoczęcia oraz po 48 godz. hodowli. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C w inkubatorze z przepływem 5-proc. CO_2 przez 2 tyg. i poddano działaniu substancji badanych:

- 17β-estradiolu,
- estriolu,
- daidzeiny (fitoestrogen),

w stężeniu 10 μM/ml. Dla stężenia 10 μM, wybranego z 8 użytych stężeń (10^{-12}, 10^{-9}, 10^{-6}, 1, 5, 10, 25 μM), uzyskano w doświadczeniu przedwstępnym, opartym na modelu oceny ruchliwości komórek („*wound assay*"), najbardziej powtarzalną zdolność migracji fibroblastów na wykonaną w warstwie rosnących komórek rysę, stanowiącą domyślną „ranę".

Właściwy eksperyment został poprzedzony doświadczeniem mającym na celu potwierdzenie zdolności fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej do migracji na siatki mono- i multifilamentowe *in vitro* (ryc. 1.).

Wszystkie hodowle wyprowadzono z linii V-31. Podłoże hodowlane zmieniano co 72 godz. Ocenę wzrostu komórek przeprowadzano w sposób jakościowy w mikroskopie świetlnym. W czasie hodowli trzykrotnie zbierano podłoże hodowlane znad taśm zasiedlonych fibroblastami powięzi łonowo-cewkowej. Zebrane medium hodowlane zamrożono i przechowywano w temperaturze –70°C, a następnie poddano radioimmunologicznej ocenie na obecność całkowitego *N*-terminalnego propeptydu kolagenu typu I przy użyciu zestawu radioimmunologicznego UNIQ PINP (Orion Diagnostica, Finlandia) zgodnie ze standardem metody.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Wartości parametrów mierzalnych przedstawiono za pomocą średniej i odchylenia standardowego. Do oceny różnic między zmiennymi zastosowano nieparametryczny test *U* Manna-Whitneya. Przyjęto poziom istotności $p < 0{,}05$ za wskazujący na istotne różnice statystyczne między ocenianymi grupami. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem programu STATISTICA 8.0 (StatSoft, Polska).

Wyniki

Wykazano zdolność fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej do biosyntezy kolagenu typu I *in vitro* w obecności polipropylenowych siatek mono- i multifilamentowych. Uwalnianie N-terminalnego propeptydu kolagenu typu I w hodowlach grupy kontrolnej prowadzonej na siatkach multifilamentowych było wyższe jedynie w 144. godz. doświadczenia i zmniejszyło się istotnie w ciągu następnych 72 godz., osiągając koncentrację mniejszą niż w hodowlach otaczających implant monofilamentowy. We wszystkich pozostałych hodowlach grupy kontrolnej i w hodowlach stymulowanych estrogenami, w każdym z przedziałów czasowych, odnotowano większe stężenie PINP w supernatantach uzyskanych znad hodowli fibroblastów prowadzonych na siatkach monofilamentowych. W hodowli kontrolnej prowadzonej na siatkach monofilamentowych uwalnianie PINP wzrastało przez cały czas trwania eksperymentu. Podobnego trendu nie wykazano dla implantu multifilamentowego.

W hodowlach prowadzonych na siatkach mono- i multifilamentowych stymulowanych 17β-estradiolem i estriolem nie odnotowano różnic w produkcji PINP przez pierwsze 72 godz. hodowli. Biosynteza kolagenu typu I była wyższa w hodowlach prowadzonych na implantach monofilamentowych już od 144. godz. doświadczenia i trend ten został utrzymany aż do końca eksperymentu. Po 216 godz. doświadczenia fibroblasty pobudzane 17β-estradiolem uwalniały więcej PINP w hodowlach prowadzonych na siatkach monofilamentowych, ale różnica ta nie była istotna statystycznie. Biosynteza kolagenu typu I przez fibroblasty powięzi łonowo-cewkowej w poszczególnych przedziałach czasowych, prowadzonych na siatkach monofilamentowych, była najwyższa w hodowlach stymulowanych estriolem.

W przypadku fitoestrogenu – daidzeiny – nie wykazano różnic w produkcji PINP przez pierwsze 144 godz. badania zarówno w hodowlach otaczających graft mono-, jak i multifilamentowy. Dopiero w 216. godz.

Ryc. 1A–C. Komórki fibroblastów rosnące na siatkach polipropylenowych. Barwienie $DIO_{3(6)}$ (3,3' dihexyloxacorbo-cyanine iodide) przez 10 min w ciemni. Zdjęcia wykonano mikroskopem konfokalnym (LSM-5, Pascal, Zeiss, Germany) przy długości fali 514 nm. Powiększenia: A–B × 50, C × 100

doświadczenia uwalnianie *N*-terminalnego prokolagenu typu I do medium było wyższe przez fibroblasty hodowane w obecności monofilamentu. W hodowlach fibroblastów stymulowanych daidzeiną prowadzonych na siatkach monofilamentowych, podobnie jak w grupie kontrolnej oraz hodowlach prowadzonych w obecności estriolu, już od początku badania uwalnianie PINP do medium rosło, osiągając szczyt w 216. godz. doświadczenia. W przypadku siatki multifilamentowej stężenie PINP w medium hodowlanym nie różniło się po 72 i 144 godz. badania, istotnie się zmniejszając w ciągu kolejnych 72 godz. (tab. II).

Estriol i daidzeina stymulowały biosyntezę kolagenu typu I bardziej niż 17β-estradiol. Dotyczyło to zarówno hodowli prowadzonych na siatkach mono-, jak i multifilamentowych (ryc. 2.).

Całkowita produkcja *N*-terminalnego propeptydu kolagenu typu I była wyższa w hodowlach prowadzonych na siatkach monofilamentowych, zwłaszcza dla estriolu i daidzeiny (ryc. 3.).

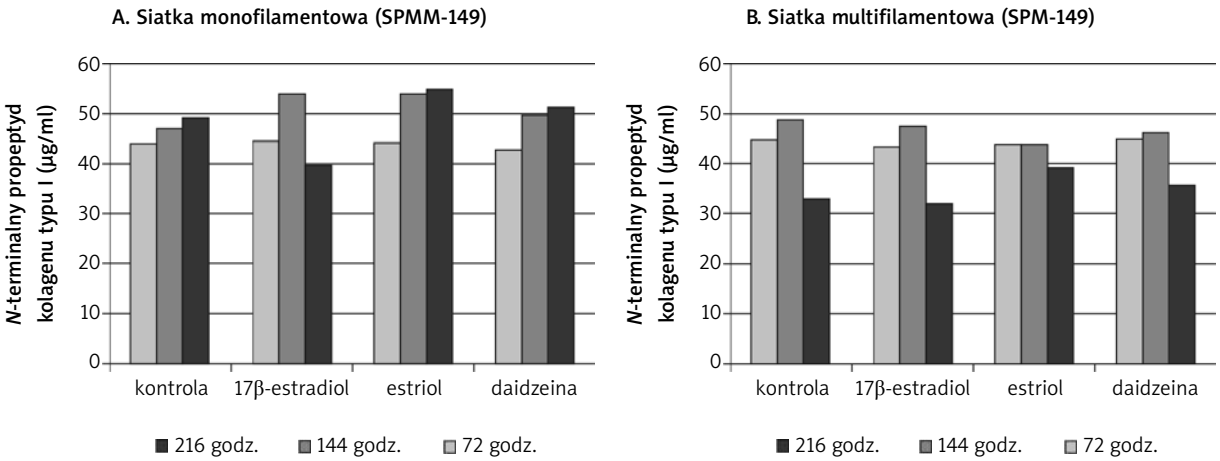
Dyskusja

W świetle reguł medycyny opartej na faktach aktualna wiedza dotycząca roli estrogenów w mechanizmach regulujących biosyntezę kolagenu w strukturach miednicy mniejszej kobiety dostarcza nam niejednoznacznych lub wręcz sprzecznych informacji. Znikoma liczba dobrze zaprojektowanych badań nie pozwala w chwili obecnej na jednoznaczne potwierdzenie lub zanegowanie ich rzeczywistej użyteczności klinicznej w uroginekologii.

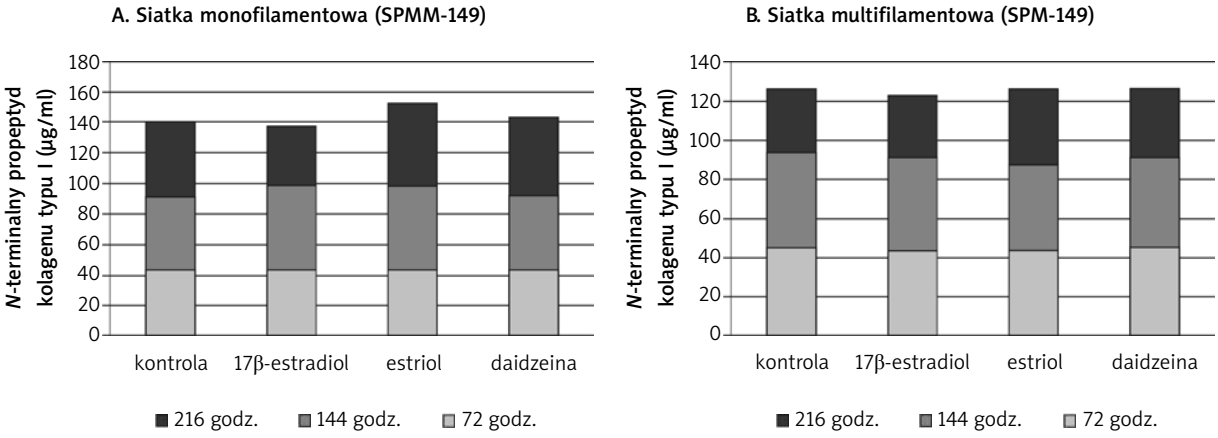
Tab. II. Stężenie N-końcowego propeptydu prokolagenu typu I (PINP) w hodowlach fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej prowadzonych na polipropylenowych siatkach multi- i monofilamentowych

		***N*-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (µg/l)**							
		kontrola		**17β-estradiol**		**estriol**		**daidzeina**	
Rodzaj siatki (mono-/multifilament)		**mono**	**multi**	**mono**	**multi**	**mono**	**multi**	**mono**	**multi**
Czas (godz.)	72	43,9 ±2,0	44,9 ±1,8	44,5 ±1,3	43,3 ±1,2	44,1 ±0,4	43,6 ±2,8	42,8 ±1,3	45,0 ±1,3
		$p = 0,55$		$p = 0,3$		$p = 0,8$		$p = 0,09$	
	144	47,0 ±0,9	48,9 ±0,1	54,0 ±0,1	47,6 ±2,9	54,0 ±0,6	42,8 ±0,1	49,5 ±2,4	45,9 ±1,1
		$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p < 0,0005$		$p = 0,07$	
	216	49,1 ±0,3	32,9 ±2,1	39,6 ±0,4	32,2 ±1,3	54,6 ±0,9	39,3 ±2,0	51,2 ±0,6	35,6 ±1,4
		$p < 0,005$		$p < 0,005$		$p < 0,005$		$p < 0,0005$	

mono – SPMM-149; multi – SPM-149



Ryc. 2A–B. Stężenie *N*-terminalnego propeptydu kolagenu typu I w hodowlach przestrzennych fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej kobiety, prowadzonych na siatkach polipropylenowych w obecności estradiolu, estriolu i daidzeiny



Ryc. 3A–B. Całkowita produkcja *N*-terminalnego propeptydu kolagenu typu I przez hodowle fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej prowadzone na siatkach polipropylenowych w obecności 17β-estradiolu, estriolu i daidzeiny przez 216 godz. eksperymentu

Analizując dostępną literaturę tematu, autorzy niniejszej pracy nie napotkali na badania dotyczące oceny biosyntezy kolagenu typu I przez fibroblasty powięzi łonowo-cewkowej kobiety namnażające się *in vitro* na siatkach polipropylenowych stosowanych w uroginekologii operacyjnej.

Podobnie jak w badaniach przeprowadzonych *in vivo* na materiale zwierzęcym przez de Almeidę i wsp. [37] oraz Bogusiewicza i wsp. [38], dotyczących zjawiska apozycji włókien kolagenowych wokół implantowanych do tkanek siatek polipropylenowych, w opisywanym w niniejszej pracy eksperymencie potwierdzono zdolność fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej kobiety do biosyntezy kolagenu typu I w warunkach *in vitro*. *N*-terminalny propeptyd kolagenu typu I wykryto w mediach hodowlanych zarówno grupy kontrolnej, jak i w hodowlach stymulowanych estrogenami prowadzonych na siatkach mono- bądź multifilamentowych.

Przeprowadzone przez autorów tej pracy badania potwierdziły wcześniejsze obserwacje Clarka i wsp. [31] dotyczące korzystnego, stymulującego działania estrogenów na biosyntezę kolagenu typu I przez komórki tkanki łącznej miednicy mniejszej kobiety. Podkreślenia wymaga fakt, że w opisywanym eksperymencie wykazano stymulujące działanie zarówno silnych, jak i słabych estrogenów na produkcję PINP przez fibroblasty powięzi łonowo-cewkowej kobiety. Co ciekawe, autorzy niniejszej pracy udowodnili, że słabe estrogeny (estriol, daidzeina) stymulują biosyntezę *N*-terminalnego propeptydu kolagenu typu I bardziej niż estradiol, uznany za najsilniejszy naturalny hormon estrogenowy.

Ta obserwacja potwierdza wyniki badań Moali i wsp. [21, 22], którzy odnotowali korzystne działanie terapii hormonalnej na całkowitą zawartość kolagenu typu I w tkance łącznej łuku ścięgnistego powięzi miednicznej.

Odpowiedź fibroblastów dotycząca biosyntezy kolagenu typu I po stymulacji estrogenami była lepiej zaznaczona dla siatek monofilamentowych. Po ekspozycji tych hodowli na estriol i daidzeinę odnotowano stały wzrost biosyntezy kolagenu typu I przez cały okres trwania doświadczenia. W hodowlach prowadzonych w obecności siatki mono- i multifilamentowej dodanie do medium 17β-estradiolu nie miało tak istotnego wpływu na biosyntezę PINP. Wyjaśnienie tego faktu jest trudne. Być może istotny wpływ na to zjawisko ma architektura zastosowanej siatki multifilamentowej (średnica włókna, konfiguracja przeplotu, gęstość węzłów czy wreszcie charakterystyka biofizyczna protezy).

Z terapeutycznego punktu widzenia najważniejsza wydaje się odpowiedź organizmu dotycząca proliferacji i migracji fibroblastów, pobudzenie ich zdolności do biosyntezy kolagenu typu I i III, białek macierzy pozakomórkowej oraz neoangiogeneza [18, 19, 30, 31]. Idealny graft nie stymuluje nadmiernej ostrej odpowiedzi zapalnej, a współczynnik migracji fibroblastów do makrofagów przesunięty jest w kierunku dominacji komórek tkanki łącznej. Stopień inkorporacji siatki przez komórki tkanki łącznej jest proporcjonalny do wielkości przestrzeni pomiędzy włóknami. Siatki o oczkach mniejszych niż 75 µm dają mniej stabilne połączenia z tkanką gospodarza ze względu na przewagę migracji histiocytów w stosunku do fibroblastów. W przypadku materiałów monofilamentowych fibroblasty swobodnie migrują przez przestrzenie między włóknami polimeru. Dla graftów multifilamentowych apozycja fibroblastów obserwowana jest tylko wzdłuż włókien siatki. Siatki „lżejsze", monofilamentowe, o dużych przestrzeniach między włóknami dają mierną, ale bardziej pożądaną odpowiedź tkankową organizmu przy paradoksalnie lepszej stabilizacji graftu. Siatki „ciężkie", wielowłókienkowe, o dużej, chropowatej powierzchni kontaktu z tkankami gospodarza charakteryzują się nadmierną odpowiedzią tkankową. Uzyskane przez autorów niniejszej pracy wyniki nie wskazują jednak na taką zależność. Być może

w warunkach *in vivo* proces włóknienia, mocniej zaznaczony dla siatek multifilamentowych, jest stymulowany przez inne czynniki, np. odpowiedź zapalną organizmu typu „około ciała obcego" na inkorporowany graft.

We wcześniejszych badaniach dotyczących proliferacji fibroblastów powięzi łonowo-szyjkowej stymulowanych estradiolem, estriolem i daidzeiną autorzy niniejszej pracy stwierdzili większą aktywność proliferacyjną komórek, ale jedynie w hodowlach suplementowanych estradiolem [39]. Ciekawy więc wydaje się fakt, że na biosyntezę kolagenu typu I estriol i daidzeina wywierają wpływ silniejszy od zaobserwowanego w hodowlach stymulowanych estradiolem. Bergink i wsp. [40], analizując zdolność przyłączania estrogenów do białka receptorowego w obrębie tkanek narządu płciowego, wykazali dla tkanek pochwy uzyskanych od kobiet będących w okresie menopauzy wysoką zdolność przyłączania estriolu do receptora estrogenowego (ER), porównywalną z siłą odnotowaną dla 17β-estradiolu. Stała dysocjacji kompleksu trytowanego estriolu z białkiem receptora estrogenowego była nieznacznie wyższa w porównaniu z odnotowaną dla trytowanego estradiolu ($4{,}3 \times 10^{-10}$ M *vs* $4{,}0 \times 10^{-10}$ M). Być może w obrębie pochwy i struktur z nią sąsiadujących estriol jest steroidem preferencyjnie wiążącym się z ER, przez co wpływ wywierany przez ten hormon na, zależny od estrogenów, metabolizm kolagenu jest bardziej zaznaczony.

Literatura dotycząca wpływu fitoestrogenów na biosyntezę kolagenu jest uboga, aczkolwiek pojawiły się doniesienia mówiące o stymulującym, zależnym od dawki, wpływie daidzeiny na zawartość włókien kolagenowych otaczających komórki tkanki łącznej [41].

Podsumowując, rezultaty przeprowadzonych przez autorów badań potwierdzają korzystny wpływ terapii estrogenami na biosyntezę kolagenu u kobiet w okresie menopauzy operowanych z powodu NM/POP. Tego typu terapia może optymalizować proces gojenia się rany pochwy i prowadzić do lepszej stabilizacji implantu polipropylenowego w obrębie struktur miednicy mniejszej w okresie wczesnej rehabilitacji pooperacyjnej.

Wnioski

1. Wykazano zdolność fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej do biosyntezy kolagenu typu I w oparciu o model przestrzenny hodowli prowadzonej na mono- i multifilamentowych siatkach polipropylenowych.
2. W przypadku słabych estrogenów (estriol, daidzeina) oraz grupy kontrolnej stężenie PINP w medium wzrastało od początku eksperymentu do 216. godz. jego trwania, ale tylko na siatkach monofilamentowych.
3. Estriol i daidzeina stymulowały biosyntezę kolagenu typu I silniej niż 17β-estradiol. Dotyczyło to zarówno hodowli prowadzonych na siatkach mono-, jak i multifilamentowych
4. Całkowita produkcja *N*-terminalnego propeptydu kolagenu typu I była wyższa w hodowlach prowadzonych na siatkach monofilamentowych.

Niniejsza praca została wykonana dzięki wsparciu finansowemu uzyskanemu z Ministerstwa Edukacji i Nauki w latach 2005–2008 [Projekt badawczy: 2PO5E01729 „Proliferacja, migracja i biosynteza kolagenu w hodowlach fibroblastów tkanki łącznej przepony moczowo-płciowej kobiety prowadzonych na biomateriałach chirurgicznych (siatki) stosowanych w uroginekologii"].

Piśmiennictwo

1. The role of local vaginal estrogen for treatment of vaginal atrophy in postmenopausal women: 2007 position statement of The North American Menopause Society. Menopause 2007; 14: 355-69.
2. Hextall A, Cardozo L. The role of estrogen supplementation in lower urinary tract dysfunction. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 2001; 12: 258-61.
3. Hextall A, Bidmead J, Cardozo L, Hooper R. Hormonal influences on the human female lower urinary tract: a prospective evaluation of the effects of the menstrual cycle on symptomatology and the results of urodynamic investigation. Neurourol Urodyn 1999; 18: 363-4.
4. Hextall A. Oestrogens and lower urinary tract function. Maturitas 2000; 36: 83-92.
5. Farage M, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina. Arch Gynecol Obstet 2006; 273: 195-202.
6. Robinson D, Cardozo L. The menopause and HRT. Urogenital effects of hormone therapy. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2003; 17: 91-104.
7. Robinson D, Cardozo LD. The role of estrogen in female lower urinary tract dysfunction. Urology 2003; 62: 45-51.
8. Jelovsek JE, Maher C, Barber MD. Pelvic organ prolapse. Lancet 2007; 369: 1027-38.
9. Boyles SH, Weber AM, Meyn L. Procedures for urinary incontinence in the United States, 1979-1997. Am J Obstet Gynecol 2003; 189: 70-5
10. Luber KM, Boero S, Choe JY. The demographics of pelvic floor disorders: current observations and future projections. Am J Obstet Gynecol 2001; 184: 1496-501.
11. Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, et al. Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. Obstet Gynecol 1997; 89: 501-6
12. Karlovsky ME, Thakre AA, Rastinehad A, et al. Biomaterials for pelvic floor reconstruction. Urology 2005; 66: 469-75.
13. Sentilhes L, Berthier A, Sergent F, et al. Sexual function in women before and after transvaginal mesh repair for pelvic organ prolapse. Int Urogynecol J 2008; 19: 763-72.
14. Berrocal J, Clave H, Cosson M, et al. Conceptual advances in the surgical management of genital prolapse. J Gynecol Obstet Biol Reprod 2004; 33: 577-87.
15. Tomaszewski J, Rechberger T. Materiały chirurgiczne w uroginekologii – co nowego? W: Rechberger T (red.). Uroginekologia praktyczna. BiFolium, Lublin 2007; 245-55.
16. Grise P. The future of biomaterials in urology. Prog Urol 2002; 12: 1305-9.
17. Fischer A. Prolapse surgery sling biomaterials. Eur Urol Suppl 2002; 1: 29-32.
18. Amid PK, Shulman AG, Lichtenstein IL, Hakakha M. Biomaterials for abdominal wall hernia surgery and principles of their applications. Langenbecks Arch Chir 1994; 379: 168-71.
19. Deprest J, Claerhout F, Zheng F, et al. Synthetic and biodegradable prostheses in pelvic floor surgery. International Congress Series 2005; 1279: 387-97.
20. Amid PK. Classification of biomaterials and their related complications in abdominal wall hernia surgery. Hernia 1997; 1: 15-21.

21. Moalli PA, Talarico LC, Sung VW, et al. Impact of menopause on collagen subtypes in the arcus tendineous fasciae pelvis. Am J Obstet Gynecol 2004; 190: 620-7.
22. Moalli PA, Klingensmith WL, Meyn LA, Zyczynski HM. Regulation of matrix metalloproteinase expression by estrogen in fibroblasts that are derived from the pelvic floor. Am J Obstet Gynecol 2002; 187: 72-9.
23. Falconer C, Ekman G, Malmström A, Ulmsten U. Decreased collagen synthesis in stress incontinent women. Obstet Gynecol 1994; 84: 583-6.
24. Holland EFN, Studd JW, Mansell JP, et al. Changes in collagen composition and cross-links in bone and skin of osteoporotic postmenopausal women treated with percutaneous estradiol implants. Obstet Gynecol 1994; 83: 180-3.
25. Jackson S, James M, Abrams P. The effect of estradiol on vaginal collagen metabolism in postmenopausal women with genuine stress incontinence. BJOG 2002; 109: 339-44.
26. Calvin M, Dyson M, Rymer J, Young SR. The effect of ovarian hormone deficiency on wound contraction in rat model. Br J Obstet Gynecol 1998; 105: 223-7.
27. Calvin M. Oestrogens and wound healing. Maturitas 2000; 34: 195-210.
28. Calvin M. Ovarian hormone deficiency and wound healing. Int Congress Series 2002; 1229: 179-85.
29. Sato T, Ito A, Mori Y, et al. Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by progesterone and oestradiol-17 beta. Biochem J 1991; 275: 645-50.
30. Slayden OD, Hettrich K, Caroll RS, et al. Estrogen enhances cystatin C expression in the macaque vagina. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 883-91.
31. Clark AL, Slayden OD, Hettrich K, Brenner RM. Estrogen increases collagen I and III mRNA expression in the pelvic support tissues of the rhesus macaque. Am J Obstet Gynecol 2005; 192: 1523-9.
32. Ashcroft GS, Mills SJ, Lei K, et al. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. J Clin Invest 2003; 111: 1309-18.
33. Ashcroft GS, Dodsworth J, van Boxtel E, et al. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. Nat Med 1997; 3: 1209-15.
34. Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, Tamaya T. Ovarian steroids regulate the expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in fibroblasts derived from uterine endometrium. Ann Clin Biochem 1997; 34: 91-6.
35. Shanker G, Sorci-Thomas M, Adams MR. Estrogen modulates the inducible expression of platelet-derived growth factor mRNA by monocyte/macrophages. Life Sci 1995; 56: 499-507.
36. Pirilä E, Ramamurthy N, Maisi P, et al. Wound healing in ovariectomized rats: effects of chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen on matrix metalloproteinases -8, -13 and type I collagen expression. Curr Med Chem 2001; 8: 281-94.
37. de Almeida SH, Rodrigues MA, Gregório E, et al. Influence of sling material on inflammation and collagen deposit in an animal model. Int J Urol 2007; 14: 1040-3.
38. Bogusiewicz M, Wróbel A, Jankiewicz K, et al. Collagen deposition around polypropylene tapes implants in the rectus fascia of female rats. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006; 124: 106-9.
39. Tomaszewski J, Adamiak A, Skorupski P i wsp. Wpływ 17beta-estradiolu i fitoestrogenu daidzeiny na aktywność proliferacyjną fibroblastów powięzi łonowo-szyjkowej i skóry uzyskanych od kobiet operowanych z powodu wysiłkowego nietrzymania moczu. Ginekol Pol 2003; 10: 1410-4.
40. Bergink EW, Kloosterboer HJ, van der Vies J. Oestrogen binding proteins in the female genital tract. J Steroid Biochem 1984; 20:1057-60.
41. Huang Y, Pan L, Xia X, et al. Long-term effects of phytoestrogen daidzein on penile cavernosal structures in adult rats. Urology 2008; 72: 220-4.