

P R A C E O R Y G I N A L N E

ginekologia

Wpływ estrogenów i tamoksifenu na biosyntezę kolagenu typu III przez fibroblasty powięzi łonowo-cewkowej w hodowlach prowadzonych na mono i multifilamentowych siatkach polipropylenowych

Collagen type III biosynthesis by cultured pubocervical fascia fibroblasts surrounding mono and multifilament polypropylene mesh after estrogens and tamoxifen treatment

Tomaszewski Jacek¹, Adamiak- Godlewska Aneta¹, Bogusiewicz Michał¹, Brzana Wojciech², Juszcak Małgorzata², Rzeski Wojciech^{2,3}, Rechberger Tomasz¹

¹ II Katedra i Klinika Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

² Zakład Toksykologii, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie

³ Zakład Wirusologii i Immunologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, UMCS w Lublinie

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy była ocena wpływu estrogenów (17β-estradolu, estriolu, daidzeiny) oraz antyestrogenu (tamoksifenu) na biosyntezę kolagenu typu III przez fibroblasty powięzi łonowo-cewkowej w warunkach hodowli prowadzonych na siatkach polipropylenowych o różnych charakterystykach dotyczących architektury i struktury implantu.

Materiał i metoda: Fibroblasty uzyskano z fragmentu powięzi łonowo-cewkowej i namnażano w hodowli. Tak otrzymane komórki linii V-31 zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano. Do eksperymentu użyto siatek: SPMM-149: siatka monofilamentowa, polipropylenowa AUTOSUTURE SURGIPROMESH oraz SPM-149: siatka multifilamentowa, polipropylenowa AUTOSUTURE SURGIPROMESH. Na siatki nałożono fibroblasty linii V-31 i poddano działaniu 17β-estradolu, estriolu, daidzeiny (fitoestrogen) oraz tamoksifenu. Ocenę wzrostu komórek przeprowadzono w mikroskopie świetlnym. W medium oznaczono radioimmunologicznie obecność całkowitego N-terminalnego propeptydu kolagenu typu III. Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej.

Adres do korespondencji:

Jacek Tomaszewski
II Katedra i Klinika Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
SPSK4, 20-954 Lublin, ul. Jaczewskiego 8
tel. 081-72 44 686 (688)
e-mail: jacunio98@yahoo.com

Otrzymano: 10.01.2010
Zaakceptowano do druku: 01.06.2010

Wyniki: Wykazano zdolność fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej do biosyntezy kolagenu typu III. Dla 17 β -estradiolu i tamoksifenu odnotowano najwyższe stężenie N-terminalnego propeptydu kolagenu typu III (PIIINP) w ciągu pierwszych 72 godzin hodowli prowadzonych na siatkach monofilamentowych. W przypadku siatki multifilamentowej stężenie PIIINP rosło do 144 godziny eksperymentu. W przypadku słabych estrogenów (estriol, daidzeina) stężenie PIIINP w medium wzrastało do 144 godziny eksperymentu zarówno w hodowlach na siatkach mono jak i multifilamentowych. Jedynie dla hodowli prowadzonych na siatkach monofilamentowych w obecności estriolu wykazano wzrost biosyntezy kolagenu typu III przez cały okres trwania doświadczenia.

Wnioski: Rezultaty naszych badań potwierdzają korzystny wpływ terapii estrogenami na biosyntezę kolagenu typu III 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.

Słowa kluczowe: **wysiłkowe nietrzymanie moczu / fibroblasty / biosynteza kolagenu /
/ estrogeny / tamoksifen /**

Abstract

Aim: Surgical procedures using synthetic implants are currently considered as the most efficient therapy for stress urinary incontinence (SUI) and pelvic organ prolapse (POP). Insertion of the tape or mesh causes enhanced collagen synthesis that largely affects the biomechanical property of the implant. This process is significantly modulated by estrogens and improper wound healing and treatment failure may result in hypoestrogenism. The aim of the study was to assess the rate of collagen type III synthesis by pubocervical fascia fibroblasts cultured with polypropylene meshes in the presence of estrogens and tamoxifen.

Material and Methods: Fibroblasts were obtained from pubo-cervical fascia sampled from a 52-year-old premenopausal woman who underwent surgical treatment for SUI and cultured with monofilament or multifilament polypropylene meshes in the presence of 17 β -estradiol, estriol, daidzein or tamoxifen. The cultures were run for 216hr and the media were replaced every 72hr. N-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) was used as a marker of collagen type III synthesis. Its concentration in the media was measured by radioimmunoassay. Pubocervical fascia fibroblast cultured with monofilament or multifilament meshes are capable of collagen type III synthesis. Following treatment with estradiol or tamoxifen, the highest PIIINP concentrations were observed after 72hr, whereas in case of estriol, daidzein or no treatment after 144hr of culture, regardless of the type of mesh used.

Results: Only in cultures containing monofilament mesh and stimulated with estriol the high rate of collagen type III synthesis persisted until the end of the experiment. Paradoxically, the highest total production of PIIINP was observed in culture treated with tamoxifen, both for multifilament and monofilament meshes.

Conclusion: The rate of collagen type III synthesis by pubocervical fascia fibroblast cultured with polypropylene meshes is subjected to modulation by estrogens and antiestrogens.

Key words: **stress urinary incontinence / fibroblasts / collagen biosynthesis /
/ estrogeny / tamoxifen /**

Wstęp

Polipropylenowe siatki i taśmy mono lub multifilamentowe są od lat stosowane w uroginekologii operacyjnej. Techniki zabiegowe oparte na implantacji graftów syntetycznych pozwalają uzyskać długotrwały sukces terapeutyczny zarówno u pacjentek cierpiących na wysiłkową lub mieszaną postać nietrzymania moczu (NM), jak i u kobiet z zaawansowanym klinicznie defektem statyki narządu płciowego (POP) [1, 2].

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. Fibroblasty, macierz kolagenowa oraz naczynia krwionośne przerastają układ przestrzenny jaki tworzy siatka/taśma/płat kolagenowy już we wczesnym okresie gojenia, co w konsekwencji prowadzi do wytworzenia *de novo* trwałej struktury zawieszająco-podpierającej. W ten sposób zostają odtworzone lub wzmocnione uszkodzone więzadła lub powięzie. Siatka/taśma polipropylenowa z jednej strony stanowi podparcie dla struktur łącznotkankowo-mięśniowych i narządów miednicy mniejszej, a z drugiej strony jest czynnikiem inicjującym wzmoczoną produkcję autologicznej tkanki łącznej.

Biosynteza kolagenu, nasilenie reakcji włóknienia, a co za tym idzie wytrzymałość biomechaniczna inkorporowanego graftu, zależy od rodzaju polimeru, średnicy włókna, typu utkania (monofilamentowe, multifilamentowe), konfiguracji przeplotu lub gęstości węzłów, gramatury (g/m²) oraz struktury powierzchni implantu (tekstura). Siatki „lżejsze”, monofilamentowe, o dużych przestrzeniach pomiędzy włóknami dają mierną, ale bardziej pożądaną odpowiedź tkankową organizmu, przy paradoksalnie lepszej stabilizacji graftu. Siatki „ciężkie”, wielowłókienkowe, sztywne i mniej elastyczne, o dużej chropowatej powierzchni kontaktu z tkankami gospodarza charakteryzują się nadmierną odpowiedzią tkankową, zarówno dotyczącą odczynu włóknienia jak i reakcji zapalnej oraz ryzyka infekcji wymagającej usunięcia graftu [1-7].

Hypoestrogenizm zaburza mechanizmy kontrolujące metabolizm kolagenu u kobiet. Konsekwencją przewlekłego niedoboru estrogenów jest zmniejszenie wytrzymałości biomechanicznej struktur łącznotkankowo-mięśniowych tworzących przeponę moczowo-płciową oraz wydłużony okres gojenia rany pooperacyjnej. Estrogeny podawane systemowo/miejscowo mogą regulować metabolizm kolagenu w komórkach

tkanki łącznej układu zawieszająco-podpierającego narząd płciowy, odpowiadając między innymi za zwiększenie zawartości kolagenu włóknikowego, białek macierzy pozakomórkowej w tkance łącznej okołocewkowej czy ekspresję cystatyny C w fibroblastach oraz komórkach mięśniowych gładkich pochwy – białka będącego inhibitorem proteiny cysteinowej, enzymu odgrywającego istotną rolę w przebudowie macierzy pozakomórkowej. Wysoka zawartość cystatyny C zwiększa wytrzymałość biomechaniczną pochwy i może opóźnić wystąpienie lub łagodzić stopień nasilenia zaburzeń statyki pochwy i podparcia cewki moczowej [8-25].

Z roku na rok wzrasta w naszym kraju liczba operacji z zastosowaniem syntetycznych materiałów chirurgicznych wykonywanych u kobiet cierpiących na NM/POP.

Odsetek pacjentek u których dojdzie do ekstruzji lub erozji taśmy/siatki we wczesnym lub odległym czasie po zabiegu uroginekologicznym dochodzi nawet do 10-13% operowanych. 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 implantowanej do struktur miednicy mniejszej. Co więcej, dobra stabilizacja implantu we wczesnym okresie rehabilitacji pooperacyjnej zmniejsza ryzyko nawrotu NM/POP a właściwe przerastania graftu przez tkankę łączną zwiększa wytrzymałość wytworzonej chirurgicznie struktury zabezpieczającej statykę narządu płciowego.

Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu estrogenów (17beta-estradolu, estriolu, daidzeiny) oraz antyestrogenu (tamoksifenu) na biosyntezę kolagenu typu III przez fibroblasty powięzi łonowo-cewkowej w warunkach hodowli prowadzonych na siatkach polipropylenowych o różnych charakterystykach dotyczących architektury i struktury implantu.

Materiał i metodyka

Wyprowadzenie linii komórkowej V-31.

Fragment powięzi łonowo-cewkowej o wym. 0,5x0,5cm pobrano od 52 letniej niemiesiączkującej kobiety operowanej z powodu NM/POP w stopniu POPQ IIA/IP. Uzyskaną tkankę natychmiast umieszczono w buforze fosforanowym (PBS) suplementowanym jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} oraz antybiotykami: penicyliną (100j/ml) i streptomycyną (100µg/ml). Tkanke rozdrobiono mechanicznie a uzyskane skrawki zawieszano w podłożu hodowlanym (DMEM D5921, Sigma) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (F9665, Sigma). Fibroblasty namnażano w butelkach umieszczonych w inkubatorze zapewniającym stabilną temperaturę (37°C) oraz wilgotną atmosferę 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 zawieszinę 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% CO_2 . Następnego dnia zmieniano podłoże na świeże w celu usunięcia toksycznego 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% trypsyny + 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 1,5cm 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.

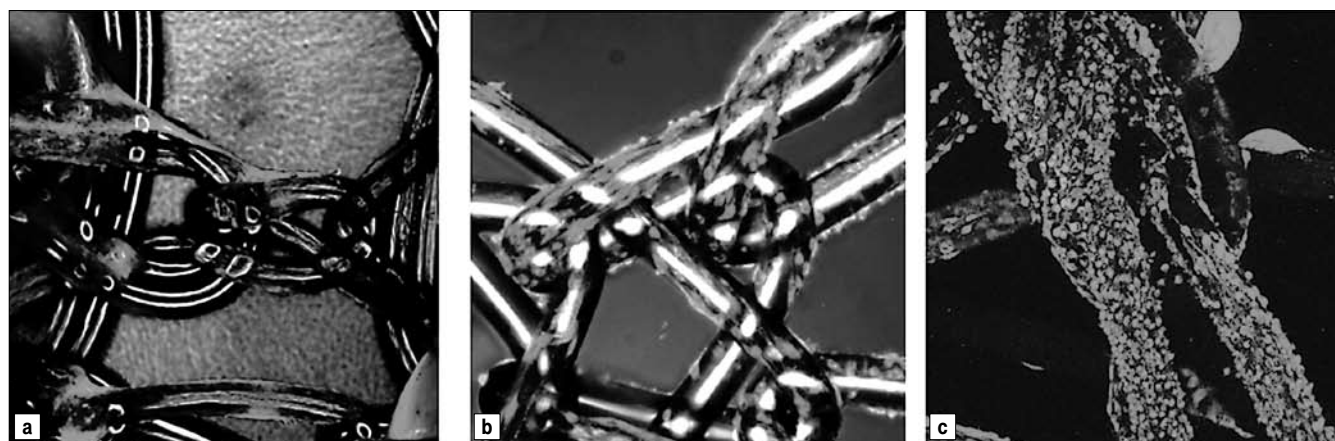
Przed założeniem hodowli fragmenty taśm poddawano stabilizacji w podłożu hodowlanym z dodatkiem 10% FBS w temperaturze 37°C przez 2 dni. Tak przygotowane fragmenty taśm przyklejano do dna płytki hodowlanej (płytki 24-dołkowe, Nunc) przy użyciu jałowego smaru silikonowego lub przytwierdzano sterylnym plastikowym zaciskiem pierścieniowym. Dołki z taśmami dwukrotnie inokulowano hodowlą fibroblastów w ilości 1×10^6 , w dniu rozpoczęcia oraz po 48 godzinach hodowli. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C w inkubatorze z przepływem 5% CO_2 przez okres 2 tygodni i poddano działaniu substancji badanych w stężeniu 10µM/ml:

- estrogenów:
 - 17β-estradolu,
 - estriolu,
 - daidzeiny (fitoestrogen),
- oraz antyestrogenu - tamoksifenu.

Dla stężenia 10µM, wybranego z 8 użytych stężeń (od 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} , 1, 5, 10, 25µM) 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*. (Rycina 1).

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



Rycina 1. Komórki fibroblastów rosnące na siatkach polipropylenowych. Barwienie DIO₃₍₆₎ (3,3' Dihexyloxacorbo-cyanine iodide)/10 min. w ciemni. Zdjęcia wykonano mikroskopem konfokalnym (LSM-5, Pascal, Zeiss, Germany) przy długości fali 514nm. Powiększenia: a) i b) x 50, c) x 100 .

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

	Typ siatki	Gramatura (g/m ²)	Średnica oczek (mm)	Grubość siatki (mm)	Metoda sterylizacji
SPMM-149	monofilament	96	0,38x0,38	0,54	tlenek etylenu
SPM-149	multifilament	85	0,29x0,29	0,54	tlenek etylenu

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Wartości parametrów mierzalnych przedstawiono przy pomocy średniej i odchylenia standardowego. Do oceny różnic pomiędzy zmiennymi zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitneya. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$ za wskazujący na istotne różnice statystyczne pomiędzy ocenianymi grupami. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o program STATISTICA 8.0 (StatSoft, Polska).

Wyniki

Wykazano zdolność fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej do biosyntezy kolagenu typu III *in vitro* w obecności polipropylenowych siatek mono i multifilamentowych. (Rycina 2).

Uwalnianie N-terminalnego propeptydu kolagenu typu III w hodowlach prowadzonych na siatkach multifilamentowych było wyższe jedynie przez pierwsze 72 godziny hodowli w grupie kontrolnej oraz w 144 godzinie hodowli z dodatkiem 17 β -estradiolu, estriolu i tamoksifenu. We wszystkich pozostałych grupach oraz przedziałach czasowych wykazano wyższe stężenie PIIINP w supernatantach uzyskanych z nad hodowli fibroblastów prowadzonych na siatkach monofilamentowych. (Tabela II).

W odniesieniu do grupy kontrolnej, po 72 godzinach eksperymentu w hodowlach na siatkach multifilamentowych nie wykazano istotnych różnic dotyczących biosyntezy kolagenu typu III przez fibroblasty hodowane w obecności 17 β -estradiolu. W hodowlach z użyciem siatek monofilamentowych nie wykazano różnic w stężeniu PIIINP pomiędzy kulturami fibroblastów traktowanymi 17 β -estradiolem w porównaniu do komórek stymulowanych daidzeiną lub tamoksifenem.

Podobnie, nie odnotowano zmian w stężeniu PIIINP w medium z nad hodowli z dodatkiem daidzeiny i tamoksifenu.

W 144 godzinie doświadczenia nie stwierdzono różnic w biosyntezie kolagenu typu III w hodowlach na siatkach multifilamentowych z dodatkiem 17 β -estradiolu, estriolu oraz daidzeiny w porównaniu do fibroblastów z grupy kontrolnej.

Nie wykazano istotnych różnic w stężeniu PIIINP pomiędzy hodowlami z dodatkiem estrogenów. Biosynteza PIIINP w hodowlach z dodatkiem tamoksifenu była zbliżona do odnotowanej dla estriolu.

W hodowlach na siatkach monofilamentowych nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych dotyczących biosyntezy kolagenu typu III jedynie w przypadku fibroblastów traktowanych tamoksifenem.

Po 216 godzinach hodowli odnotowano wyższe stężenie PIIINP we wszystkich hodowlach prowadzonych na siatkach monofilamentowych. Za wyjątkiem hodowli prowadzonej na siatkach monofilamentowych w obecności estriolu, stężenie PIIINP w analizowanych grupach istotnie się zmniejszyło w porównaniu do wyjściowych wartości z 72 godziny eksperymentu. Dotyczyło to wszystkich hodowli prowadzonych na siatkach multifilamentowych a dla siatek monofilamentowych grupy kontrolnej oraz grupy traktowanej 17 β -estradiolem, daidzeiną i tamoksifenem. (Tabela III).

Całkowite uwalnianie N-terminalnego propeptydu kolagenu typu III była najwyższa dla hodowli prowadzonych w obecności tamoksifenu. Dotyczyło to zarówno siatek mono jak i multifilamentowych. (Rycina 3).

Wpływ estrogenów i tamoksifenu na biosyntezę kolagenu typu III ...

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

Rodzaj siatki (mono/ multifilament)		N-końcowy propeptyd prokolagenu typu III (PIIINP) ($\mu\text{g/l}$)							
		Kontrola		17 β -estradiol		Estriol		Daidzeina	
		Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi
Czas (godziny)	72	114,9 \pm 5,7	128,4 \pm 0,8	140,7 \pm 6,2	128,5 \pm 3,8	95,1 \pm 2,0	77,9 \pm 2,9	139,2 \pm 7,2	101,1 \pm 5,8
		p < 0,05		p < 0,005		p < 0,005		p < 0,005	
	144	135,60 \pm 3,1	136,9 \pm 3,3	126,2 \pm 2,6	132,6 \pm 1,2	130,4 \pm 1,2	144,4 \pm 5,5	153,5 \pm 4,5	134,2 \pm 7,2
		NS		p < 0,05		p < 0,005		p < 0,05	
	216	102,45 \pm 3,4	66,8 \pm 1,9	89,7 \pm 3,3	56,3 \pm 1,9	131,8 \pm 3,2	92,0 \pm 0,7	80,7 \pm 1,0	76,0 \pm 1,4
		p < 0,005		p < 0,005		p < 0,0005		p < 0,005	
		Tamoksifen							
Czas (godziny)	72	143,2 \pm 3,7	120,6 \pm 3,1	Mono: SPMM-149 Multi: SPM-149					
		p < 0,005							
	144	136,8 \pm 4,1	153,9 \pm 4,2						
		p < 0,005							
	216	115,1 \pm 4,6	82,4 \pm 3,0						
		p < 0,005							

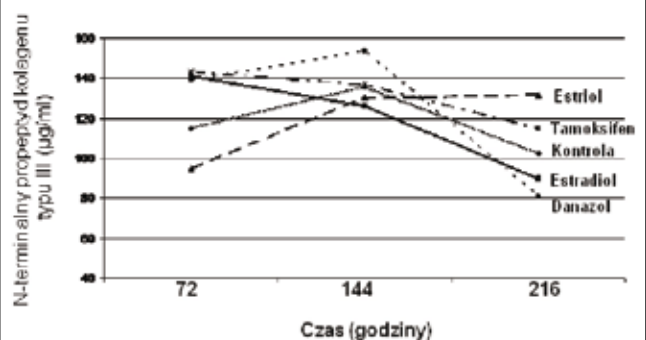
Dyskusja

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

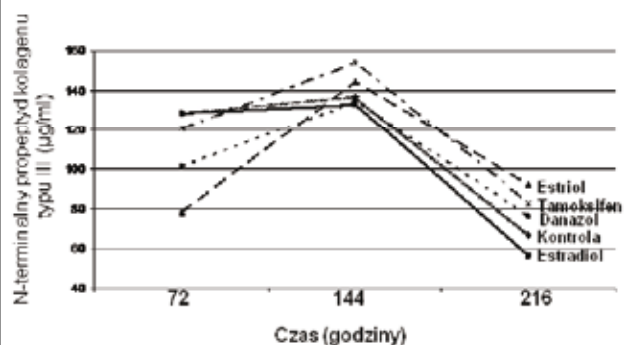
Analizując dostępną literaturę tematu nie napotkaliśmy na badania dotyczące oceny biosyntezy kolagenu typu III przez fibroblasty powięzi łonowo-cewkowej kobiety namnażające się in vitro na siatkach polipropylenowych stosowanych w uroginekologii operacyjnej.

Estrogeny poprzez wpływ na aktywność kolagenolityczną komórek tkanki łącznej biorą udział w fazie gojenia rany poporacycznej. Sterydy te zmniejszają aktywność kolagenolityczną metaloproteinaz oraz stymulują biosyntezę tkankowych inhibitorów metaloproteinaz przez co zwiększają obrót metaboliczny kolagenu w obrębie miednicy mniejszej [20-23]. Utracie „starego” kolagenu towarzyszy wzrost biosyntezy „młodego” kolagenu mierzony zwiększeniem stężenia niedojrzałych wiązań krzyżowych kolagenu: hydroksylizynonorleucynowych oraz hydroksylizynoketonorleucynowych [16-18]. Moali i wsp. odnotowali zmniejszenie całkowitej zawartości kolagenu typu I w stosunku do kolagenu typu III i V aż o 75% w tkance łącznej łuku ścięgienistego powięzi miednicznej, ale tylko u kobiet nie stosujących hormonalnej terapii substytucyjnej [16].

a) Siatka monofilamentowa (SPMM-149)



b) Siatka multifilamentowa (SPM-149)



Rycina 2. Stężenie N-terminalnego propeptydu kolagenu typu III w hodowlach przestrzennych fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej kobiety prowadzonych na siatkach polipropylenowych w obecności estradiolu, estriolu, daidzeiny i tamoksifenu.

Tabela III. Różnice w stężeniu PIIINP w medium z nad hodowli komórkowych prowadzonych na siatkach mono i multifilamentowych po 72 (A), 144 (B) oraz 216 (C) godzinach eksperymentu.

A.

		N-końcowy propeptyd prokolagenu typu III (PIIINP) (µg/l)									
		Kontrola		17β-estradiol		Estriol		Daidzeina		Tamoksifen	
		Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi
Kontrola	Mono		p<0,05	p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05	
	Multi	p<0,05			ns		p<0,05		p<0,05		p<0,05
17β-estradiol	Mono	p<0,05			p<0,05	p<0,05		ns		ns	
	Multi		ns	p<0,05			p<0,05		p<0,05		p<0,05
Estriol	Mono	p<0,05		p<0,05			p<0,05	p<0,05			p<0,05
	Multi		p<0,05		p<0,05	p<0,05			p<0,05		p<0,05
Daidzeina	Mono	p<0,05		ns		p<0,05			p<0,05	ns	
	Multi		p<0,05		p<0,05		p<0,05	p<0,05			p<0,05
Tamoksifen	Mono	p<0,05		ns		p<0,05		ns			p<0,05
	Multi		p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05	p<0,05	

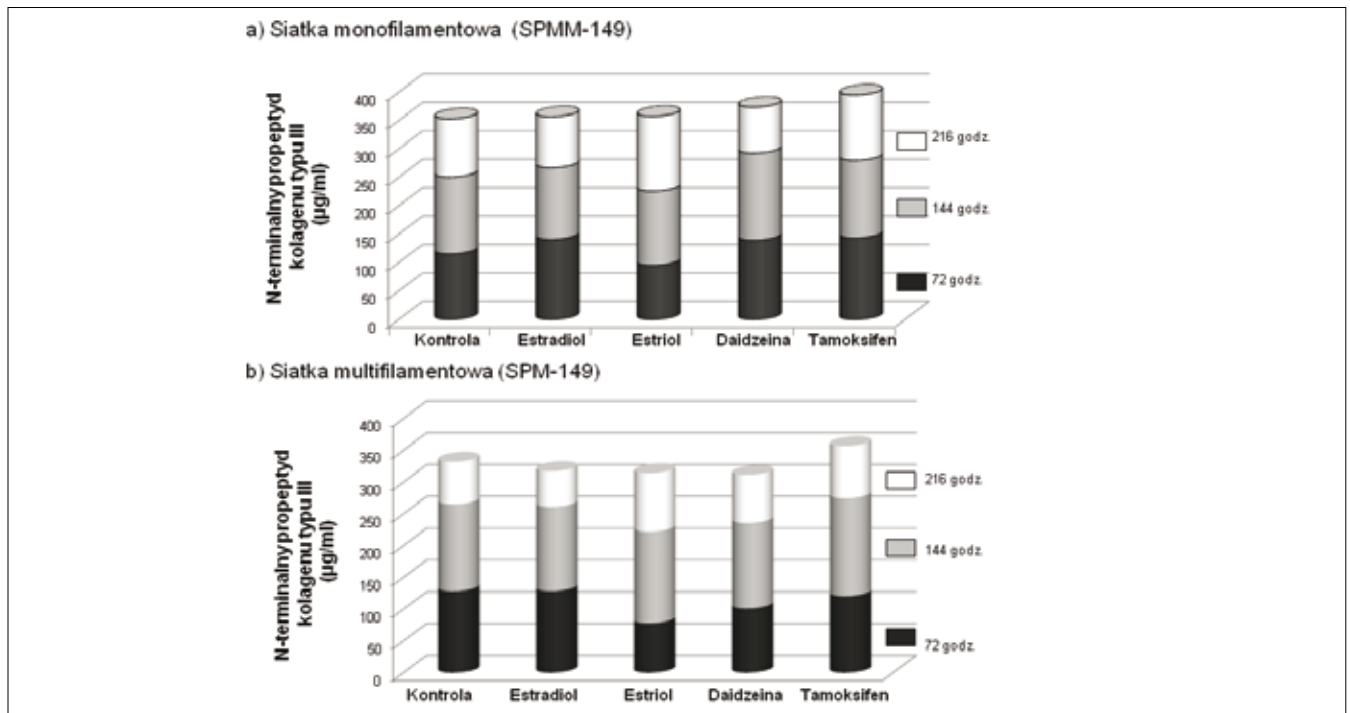
B.

		N-końcowy propeptyd prokolagenu typu III (PIIINP) (µg/l)									
		Kontrola		17β-estradiol		Estriol		Daidzeina		Tamoksifen	
		Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi
Kontrola	Mono		ns	p<0,05		p<0,05		p<0,05		ns	
	Multi	ns			ns		ns		ns		p<0,05
17β-estradiol	Mono	p<0,05			p<0,05	p<0,05		p<0,05		p<0,05	
	Multi		ns	p<0,05			p<0,05		ns		p<0,05
Estriol	Mono	p<0,05		p<0,05			p<0,05	p<0,05		p<0,05	
	Multi		ns		p<0,05	p<0,05			ns		ns
Daidzeina	Mono	p<0,05		p<0,05		p<0,05			p<0,05	p<0,05	
	Multi		ns		ns		p<0,05	p<0,05			p<0,05
Tamoksifen	Mono	ns		p<0,05		p<0,05		p<0,05			p<0,05
	Multi		p<0,05		p<0,05		ns		p<0,05	p<0,05	

C.

		N-końcowy propeptyd prokolagenu typu III (PIIINP) (µg/l)									
		Kontrola		17β-estradiol		Estriol		Daidzeina		Tamoksifen	
		Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi	Mono	Multi
Kontrola	Mono		p<0,05	p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05	
	Multi	p<0,05			p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05
17β-estradiol	Mono	p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05	
	Multi		p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05
Estriol	Mono	p<0,05		p<0,05			p<0,05	p<0,05		p<0,05	
	Multi		p<0,05		p<0,05	p<0,05			p<0,05		p<0,05
Daidzeina	Mono	p<0,05		p<0,05		p<0,05			p<0,05	p<0,05	
	Multi		p<0,05		p<0,05		p<0,05	p<0,05			p<0,05
Tamoksifen	Mono	p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05			p<0,05
	Multi		p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05	p<0,05	

Wpływ estrogenów i tamoksifenu na biosyntezę kolagenu typu III ...



Rycina 3. Całkowita produkcja N-terminalnego propeptydu kolagenu typu III przez hodowle fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej prowadzone na siatkach polipropylenowych w obecności estradiolu, estriolu, daidzeiny i tamoksifenu przez okres 216 godzin eksperymentu.

Clark i wsp. wykazała, że u naczelnych estradiol stymulował w łącznotkankowym aparacie zawieszającym ekspresję mRNA dla I i III typu kolagenu [25].

Na modelu zwierzęcym 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 zwiększają 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 [26-30].

Podobnie do wyników badań przeprowadzonych *in vivo* na materiale zwierzęcym przez de Almeida i wsp. [31] oraz Bogusiewicz i wsp. [6] a dotyczących zjawiska apozycji włókien kolagenowych wokół implantowanych siatek polipropylenowych, w naszym eksperymencie potwierdziliśmy zdolność fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej kobiety do biosyntezy kolagenu *in vitro*, co udokumentowaliśmy wykryciem N-terminalnego propeptydu kolagenu typu III w mediach hodowlanych.

Zjawisko to odnotowano zarówno dla grupy kontrolnej jak i w hodowlach prowadzonych na siatkach mono jak i multifilamentowych. Biosynteza kolagenu typu III przez fibroblasty powięzi łonowo-cewkowej grupy kontrolnej była istotnie wyższa w obecności implantu multifilamentowego dla pierwszych 72 godzin doświadczenia.

Dopiero w 9 dobie eksperymentu efekt ten był wyraźniej zaznaczony dla hodowli z użyciem materiałów opartych na włóknach monofilamentowych.

Odpowiedź fibroblastów dotycząca biosyntezy kolagenu typu III po stymulacji estrogenami, daidzeiną oraz tamoksifenem wydaje się być bardziej zaznaczona dla siatek monofilamentowych. Po ekspozycji tych hodowli na 17 β -estradiol, daidzeinę i tamoksifen odnotowano wzrost biosyntezy kolagenu typu III w okresie pierwszych 72h badania. Daidzeina stymulowała produkcję kolagenu nawet przez okres pierwszych 6 dni doświadczenia. Takiego efektu nie potwierdzono dla 17 β -estradiolu i tamoksifenu. Estriol powodował istotny wzrost uwalniania PIIINP przez hodowane fibroblasty dopiero po 9 dniach stymulacji.

W hodowlach w obecności siatki multifilamentowej dodanie do medium 17 β -estradiolu nie miało istotnego wpływu na biosyntezę kolagenu typu III. Fibroblasty namnażające się na siatkach multifilamentowych w medium z obecnością estriolu i tamoksifenu uwalniały więcej PIIINP dopiero po 6 dobach eksperymentu, a dla hodowli z daidzeiną, aż po 9 dniach doświadczenia.

W naszych wcześniejszych badaniach dotyczących proliferacji fibroblastów powięzi łonowo-szyjkowej stymulowanych estradiolem i daidzeiną stwierdziliśmy większą aktywność proliferacyjną komórek ale jedynie w hodowlach z suplementowanymi estradiolem [32]. Ciekawym więc wydaje się fakt, że na biosyntezę kolagenu typu III daidzeina wywiera efekt zbliżony do zaobserwowanego po podaniu estradiolu. 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 w tkankach [33].

Interesująca jest obserwacja dotycząca wpływu tamoksifenu na zwiększenie biosyntezy kolagenu typu III. Najprawdopodobniej obserwujemy tu paradoksalny efekt związany ze zjawiskiem słabego, estrogenopodobnego działania tamoksifenu na fibroblasty tkanki łącznej, który został potwierdzony także dla innych selektywnych modulatorów receptora estrogenowego (SERM). Stymulujący wpływ raloksifenu na syntezę kolagenu wykazano w hodowlach fibroblastów skóry [34]. Z drugiej strony tamoksifen znajduje zastosowanie jako lek hamujący procesy idiopatycznego włóknienia zaotrzewnowego [35], czy nadmiernego bliznowacenia ran [36]. Najprawdopodobniej tak różny od oczekiwanego wynik działania tamoksifenu zależy od zastosowanej dawki i długości stosowania leku i potwierdza naszą dotychczasową wiedzę dotyczącą często nieprzewidywalnego działania antyestrogenów w komórkach narządów docelowych na poziomie biomolekularnym [37].

Wnioski

1. Wykazano zdolność fibroblastów powięzi łonowo-cewkowej do biosyntezy kolagenu typu III w oparciu o model przestrzenny hodowli prowadzonej na mono i multifilamentowych siatkach polipropylenowych.
2. Dla 17 β -estradiolu i tamoksifenu odnotowano najwyższe stężenie N-terminalnego propeptydu kolagenu typu III w ciągu pierwszych 72 godzin hodowli prowadzonych na siatkach monofilamentowych. W przypadku siatki multifilamentowej stężenie PIIINP rosło do 144 godziny eksperymentu.
3. W przypadku słabych estrogenów (estriol, daidzeina) stężenie PIIINP w medium wzrastało do 144 godziny eksperymentu zarówno w hodowlach na siatkach mono jak i multifilamentowych. Podobny trend odnotowano dla hodowli prowadzonych na siatkach multifilamentowych w obecności tamoksifenu.
4. Jedynie dla hodowli prowadzonych na siatkach monofilamentowych w obecności estriolu wykazano wzrost biosyntezy kolagenu typu III przez cały okres trwania doświadczenia.
5. Całkowita produkcja N-terminalnego propeptydu kolagenu typu III była najwyższa dla hodowli prowadzonych w obecności tamoksifenu zarówno w hodowlach fibroblastów prowadzonych na siatkach mono jak i multifilamentowych.

Niniejsza praca została wykonana dzięki wsparciu finansowemu uzyskanemu z Ministerstwa Edukacji i Nauki w latach 2005-2008.

(Projekt badawczy: 2P05E01729 „Proliferacja, migracja i biosynteza kolagenu w hodowlach fibroblastów tkanki łącznej przepony moczowo-płciowej kobiety prowadzonych na biomateriałach chirurgicznych (siatki) stosowanych w urologologii”).

Piśmiennictwo

1. Berrocal J, Clave H, Cosson M, [et al.]. Conceptual advances in the surgical management of genital prolapse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2004, 33, 577-587.
2. Rechberger T, Futyma K, Miotła P, [et al.]. Changing trends in the surgical treatment of female stress urinary incontinence - twenty two years observation. *Ginekol Pol.* 2008, 79, 36-41.
3. Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V. Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. *Biomaterials.* 1998,19, 2235-2246.

4. Klinge U, Klosterhalfen B, Müller M, [et al.]. Shrinking of polypropylene mesh in vivo: an experimental study in dogs. *Eur J Surg.* 1998, 164, 965-969.
5. Marois Y, Cadi R, Gourdon J, [et al.]. Biostability, inflammatory response, and healing characteristics of a fluoropassivated polyester-knit mesh in the repair of experimental abdominal hernias. *Artif Organs.* 2000, 24, 533-543.
6. Bogusiewicz M, Wróbel A, Jankiewicz K, [et al.]. Collagen deposition around polypropylene tapes implanted in the rectus fascia of female rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006, 124, 106-109.
7. Tomaszewski J, Rechberger T. Materiały chirurgiczne w urologologii - co nowego? W: *Urologologia praktyczna.* Red. Rechberger T. Lublin, BiFolium, 2007, 245-255.
8. Keane D, Sims T, Abrams P, [et al.]. Analysis of collagen status in premenopausal nulliparous women with genuine stress incontinence. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997, 104, 994-998.
9. Falconer C, Ekman G, Malmstrom A, [et al.]. Decreased collagen synthesis in stress incontinent women. *Obstet Gynecol.* 1994, 84, 583-586.
10. Rechberger T, Adamiak A, Skorupski P, [et al.]. Collagen metabolism in women suffering from stress urinary incontinence. *Polish J Gynecol Invest.* 1999, 2, 21-24.
11. Adamiak A, Jakimiuk J, Miturski R, [et al.]. Ekspresja receptora estrogenowego alfa i beta w powięzi łonowo-szyjkowej kobiet - doniesienie wstępne. *Materiały Naukowe Zjazdu Złotyckiego Sekcji Urologologii PTG.* Lublin, 2002,45-46.
12. Iosif C, Batra S, Ek A, [et al.]. Estrogen receptors in the human female lower urinary tract. *Am J Obstet Gynecol.* 1981, 141, 817-820.
13. Wilson P, Barker G, Barnard R, [et al.]. Steroid hormone receptors in female lower urinary tract. *Urol Int.* 1984, 39, 5-8.
14. Smith P, Heimer G, Norgren A, [et al.]. Steroid hormone receptors in pelvic muscles and ligaments in women. *Gynecol Obstet Invest.* 1990, 30, 27-30.
15. Holland E, Studd J, Mansell J, [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, 180-183.
16. Moalli P, Klingensmith W, Meyn L, [et al.]. Regulation of matrix metalloproteinase expression by estrogen in fibroblasts that are derived from the pelvic floor. *Am J Obstet Gynecol.* 2002, 187, 72-79.
17. Moali P, Talarico L, Sung V. Impact of menopause on collagen subtypes in the arcus tendineus fasciae pelvis. *AJOG.* 2004, 190, 620-627.
18. Jackson S, James M, Abrams P. The effect of estradiol on vaginal collagen metabolism in postmenopausal women with genuine stress incontinence. *BJOG.* 2002, 109, 339-344.
19. Ulmsten U, Ekman G, Gierth G, [et al.]. Differential biochemical composition of connective tissue in continent and stress incontinent women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1987, 66, 455-459.
20. Calvin M, Dyson M, Rymer J, Young S. The effects of ovarian hormone deficiency on wound contraction in a rat model. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998, 105, 223-227.
21. Calvin M. Estrogens and wound healing. *Maturitas.* 2000, 34, 195-210.
22. Calvin M. Ovarian hormone deficiency and wound healing. *Int Congress Series.* 2002, 1229, 179-185.
23. 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, 645-650.
24. Slayden O, Heltrich K, Carroll R, [et al.]. Estrogen enhances cystatin C expression in the macaque vagina. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89, 883-891.
25. Clark A, Slayden O, Heltrich K, [et al.]. Estrogen increases collagen I and III mRNA expression in the pelvic support tissues of the rhesus macaque. *AJOG.* 2005, 192, 1523-1529.
26. Ashcroft G, Mills S, Lei K, [et al.]. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest.* 2003, 111, 1309-1318.
27. Ashcroft G, Dodsworth J, van Boxtel E, [et al.]. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. *Nat Med.* 1997, 3, 1209-1215.
28. Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, [et al.]. Ovarian steroids regulate the expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in fibroblasts derived from uterine endometrium. *Ann Clin Biochem.* 1997, 34, 91-96.
29. Shanker G, Sorci-Thomas M, Adams M. Estrogen modulates the inducible expression of platelet-derived growth factor mRNA by monocyte/macrophages. *Life Sci.* 1995, 56, 499-507.
30. Pirila 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, 281-294.
31. de Almeida S, Rodrigues M, Gregorio E, [et al.]. Influence of sling material on inflammation and collagen deposit in an animal model. *Int J Urol.* 2007, 14, 1040-1043.
32. Tomaszewski J, Adamiak A, Skorupski P, [i wsp.]. Wpływ 17 beta-estradiolu i fito-estrogenu daidzeiny na aktywność proliferacyjną fibroblastów powięzi łonowo-szyjkowej i skóry uzyskanych od kobiet operowanych z powodu wysiłkowego nietrzymania moczu. *Ginekol Pol.* 2004, 74, 1410-1414.
33. Huang Y, Pan L, Xia X, [et al.]. Long-term effects of phytoestrogen daidzein on penile cavernosal structures in adult rats. *Urology.* 2008, 72, 220-224.
34. Suraziński A, Jarzabek K, Haczyński J, [et al.]. Differential effects of estradiol and raloxifen on collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2003, 12, 803-809.
35. Chambers J, McGovern K. Tamoxifen for retroperitoneal fibrosis. *Palliat Med.* 2005, 19,163-164.
36. Hu D, Hughes M, Cherry G. Topical tamoxifen: a potential therapeutic regimen in treating excessive dermal scarring? *Br J Plast Surg.* 1998, 51, 462-469.
37. MacGregor J, Jordan C. Basic Guide to the Mechanism of Antiestrogen Action. *Pharmacol Rev.* 1998, 50, 151-196.