

# ИЗМЕНЕНИЯ ОБМЕНА КОЛЛАГЕНА В ТКАНИ ВНУТРИМАТОЧНОЙ ПЕРЕГОРОДКИ У ЖЕНЩИН, СТРАДАЮЩИХ ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ

## ВВЕДЕНИЕ

Процессы повышенного образования коллагена и избыточное развитие фиброзной ткани, приводящие к нарушению репродуктивной функции – одна из важных проблем гинекологии [9]. Формирование внутриматочной перегородки, являющееся следствием аномального эмбрионального развития, может быть связано с изменениями со стороны соединительной ткани, состояние которой обуславливает ее морфогенез [1]. Учитывая спорную роль внутриматочной перегородки как причины бесплодия, изучение обмена компонентов соединительной ткани, обоснование методов хирургической и фармакологической коррекции представляет собой актуальный вопрос. При этом следует подчеркнуть, что особенности коллагенообразования в ткани внутриматочной перегородки у женщин, страдающих привычным невынашиванием, до последнего времени не исследовались.

## ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью данной работы было определение особенностей коллагенообразования в тканях, полученных при резекции внутриматочной перегородки. Дополнительная задача исследования – изучение особенностей синтеза коллагена при применении в период дооперационной подготовки лечебного комплекса, включавшего метилпреднизолон, пентоксифиллин и никотинамид. Выбор данных препаратов обусловлен важной ролью глюкокортикоидов как в контроле репаративных пролиферативных процессов, так и в уменьшении действия андрогенов, которые в свою очередь стимулируют образование коллагена [9]. В то же время пентоксифиллин является препаратом, снижающим продукцию провоспалительных цитокинов и улучшающим реологические свойства крови [6], а никотинамид обеспечивает противовоспалительное, антиоксидантное действие и подавляет процессы апоптоза [8].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были проведены у 20 пациенток, которым осуществляли оперативное вмешательство по поводу полной внутри-

маточной перегородки. Все исследования соответствовали требованиям приказа Минздрава Украины № 281 от 01.11.2000 г. «Про затвердження Інструкції про проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань та Типового положення про комісію з питань етики» и одобрены комиссией по биоэтике ОНМедУ.

Диагноз внутриматочной перегородки был поставлен на основании УЗИ органов малого таза, гистеросальпингографии и гистероскопии. Гистероскопическую резекцию внутриматочной перегородки проводили в ранней пролиферативной фазе под общим наркозом. Дистензию полости матки осуществляли ирригационным раствором туросола (ООО «Юрия-Фарм», Украина). Резекцию проводили с помощью монополярного ножа (KarlStorz, Германия), начиная с нижнего края перегородки и продолжая перпендикулярно оси матки по средней линии. Операция считалась выполненной, когда при панорамном виде визуализировались трубные углы [2].

В течение 2 недель перед процедурой резекции 10 пациенток, у которых отсутствовали противопоказания, получали препараты метилпреднизолон (2 мг в день внутрь), пентоксифиллин (100 мг 3 раза в день внутрь) и никотинамид (5% раствор, по 10 мг 2 раза в день внутримышечно). Другие 10 пациенток не принимали указанный лечебный комплекс. В качестве контроля применяли ткань эндометрия женщин, полученную при диагностической гистероскопии с ретроспективным диагнозом нормы (10 пациенток).

Ткань перегородки (биооптат) в течение 180 мин выдерживали в 3 мл модифицированного раствора Кребса. Контролем служили биооптаты эндометрия и подлежащей ткани, полученные при диагностической гистероскопии у женщин с диагнозом нормы (10 образцов).

Проводили изучение интенсивности синтеза коллагена [7]. После преинкубации в растворе, содержащем нерадиоактивный пролин в количестве 0,5 мМ, ткань биооптата переносили в идентичный буферный раствор, содержав-



### В.Н. ЗАПОРОЖАН

д. мед. н., академик НАМН Украины, ректор Одесского национального медицинского университета, профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 ОНМедУ

ORCID: 0000-0002-4933-4285

### В.И. ГЛАДЧУК

к. мед. н., аспирант кафедры акушерства и гинекологии № 1 ОНМедУ

ORCID: 0000-0002-7170-465X

### В.Г. МАРИЧЕРЕДА

д. мед. н., проректор ОНМедУ, профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 ОНМедУ

ORCID: 0000-0002-1611-3654

### Н.Н. РОЖКОВСКАЯ

д. мед. н., профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 ОНМедУ

ORCID: 0000-0001-7860-3272

### Контакты:

Рожковская Наталья Николаевна  
ОНМедУ, кафедра акушерства и гинекологии № 1

65082, Одесса, пер. Валиховский 2  
тел.: +38 (048)723 29 01

e-mail: nrozhkovska@ukr.net

ший 1,0 мкКи [<sup>3</sup>H]-пролина]/3 мл (New England Nuclear, Бостон, США). С целью дозозависимой количественной оценки синтеза коллагена образцы дополнительно инкубировались в данном растворе от 15 до 120 мин.

Далее экстрагировали и анализировали тканевую ДНК [4]. Вновь синтезированный коллагеновый белок ткани биоптата растворяли с помощью воздействия кислого пепсина и очищали методом преципитации NaCl при кислом и нейтральном pH [10]. Оставшуюся часть ткани гидролизировали в растворе HCl при 108 °C в течение 18 ч и квалифицировали как «не содержащую коллаген фракцию биоптатов». Радиоактивные распады [<sup>3</sup>H]-коллагена в обеих фракциях регистрировали с помощью счетчика Ruck-beta (США) и выражали в единицах дезинтеграции в минуту (dpm) на мг ДНК. В каждой серии инкубировали не менее шести образцов ткани. Определение относительного содержания синтезированного коллагена осуществляли по показателю соотношения остатков пролина в коллагеносодержащей фракции и не содержащей коллаген фракции биоптатов.

Результаты обрабатывали статистически с использованием критериев, принятых в медико-биологических исследованиях – ANOVA (analysis of variance) и Newman-Keuls (с использованием программы Biostatistics, США).

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

При длительности инкубации исследуемых образцов на протяжении 30 минут регистрировалось достоверное двукратное увеличение включения [<sup>3</sup>H]-пролина образцами ткани у пациенток с традиционной предоперационной подготовкой в сравнении с показателем в контроле (p < 0,05) (табл.). При такой продолжительности инкубации образцы ткани внутриматочной перегородки у пациенток, в отношении которых в предоперационный период применяли разработанное лечение (метилпреднизолон, пентоксифиллин и никотинамид), вклю-

чали большее количество [<sup>3</sup>H]-пролина (на 30,2% больше, p < 0,05) в сравнении с показателем в группе пациенток с традиционной подготовкой к операции. При этом данный показатель оставался на 35,0% ниже, чем в группе контроля (p < 0,05).

При длительности инкубации в 60 мин в образцах тканей пациенток с традиционной подготовкой включение [<sup>3</sup>H]-пролина было на 88,4% больше, чем в группе контроля (p < 0,05) (табл.). При этой же экспозиции количество включенного [<sup>3</sup>H]-пролина тканью пациенток с применением разработанного лечебного комплекса превышало аналогичный показатель в группе контроля на 35,5% (p < 0,05) и было на 26,0% меньшим в сравнении с показателем у женщин с традиционной предоперационной подготовкой (p < 0,05).

При максимальной 2-часовой продолжительности инкубации образцов ткани, полученных у пациенток с традиционной предоперационной подготовкой, количество включенного [<sup>3</sup>H]-пролина было в 2,2 выше, чем в группе контроля (p < 0,05), в то время как в группе с разработанными лечебными мероприятиями аналогичное превышение составило 60,0% (p < 0,05) (табл.). При этом количество включенного [<sup>3</sup>H]-пролина в последней группе было на 37,1% меньше, чем в группе с традиционной подготовкой (p < 0,05).

Оценка интенсивности синтеза коллагена (относительного содержания вновь синтезированного коллагена) показала, что в группе пациенток с традиционной предоперационной подготовкой данный показатель увеличивался на 40,2% в сравнении с таковым в группе контроля (p < 0,05) (рис.). В то же время в группе женщин, при подготовке к операции которых применялся разработанный лечебный комплекс, этот показатель был на 15,2% выше, чем в группе контроля (p > 0,05), и при этом достоверно меньшим по сравнению с аналогичным показателем в группе пациенток с традиционной предоперационной подготовкой (p < 0,05) (рис.).



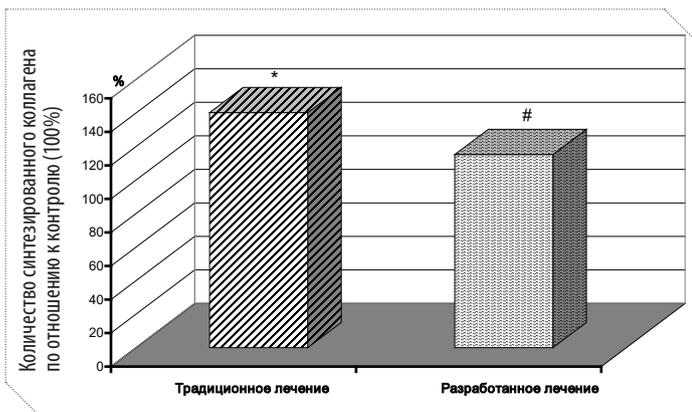
В ткани перегородки матки, представляющей собой главный фактор привычного невынашивания, отмечается выраженное увеличение интенсивности синтеза коллагена

**Таблица.** Изменение обмена коллагена ткани биоптатов, полученных у пациенток при резекции внутриматочной перегородки, M ± m

	<sup>3</sup> H- коллаген (dpm/мг ДНК)		
	Время инкубации в среде с 0,5 мМ пролина (мин)		
	30	60	120
Контроль (n = 10)	2105 ± 274	4220 ± 345	5170 ± 390
Традиционная подготовка к оперативному вмешательству (n = 10)	4218 ± 406*	7950 ± 493*	11345 ± 630*
Разработанный лечебный комплекс в предоперационном периоде (n = 10)	2740 ± 310**	6120 ± 410**	8275 ± 486**

\* p < 0,05 в сравнении с показателем в группе контроля;

\*\* p < 0,05 в сравнении с показателем пациенток, у которых в предоперационный период применялись традиционные лечебные мероприятия (ANOVA и Newman-Keuls тесты)



**Рисунок.** Изменения количества синтезированного коллагена в образцах удаленных тканей перегородки при различных условиях предоперационной подготовки

\*  $p < 0,05$  в сравнении с контролем;

#  $p < 0,05$  в сравнении с традиционной предоперационной подготовкой

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследования, в ткани внутриматочной перегородки, являющейся одним из основных факторов привычного невынашивания беременности, отмечается выраженное увеличение интенсивности синтеза коллагена. Подобные изменения могут иметь универсальное значение и определять особенности репродуктивной функции женщины, в том числе перистальтическую активность матки, а также микроокружение оплодотворенной яйцеклетки, не обеспечивающее необходимые условия ее развития [9].

Проведение фармакотерапии с применением препаратов, снижающих уровень провоспалительных цитокинов – пентоксифиллина и никотинамида, оказывающих комплексное влияние на развитие воспалительного процесса, в существенной степени нормализует интенсивность процессов образования коллагена. Этот результат также доказывает роль цитокинов в развитии привычного невынашивания у женщин с внутриматочной перегородкой.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Серов, В.В., Шехтер, А.Б. Соединительная ткань: функциональная морфология и общая патология. – М.: Медицина. – 1981. – 312 с.  
Serov, V.V., Shekhter, A.B. Connective tissue: functional morphology and common pathology. Moscow. Medicine (1981): 312 p.
2. Mencaglia, L., Carri, G., Prasciolu, C., et al. "Feasibility and complications in bipolar resectoscopy: Preliminary experience." *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies* 22.1 (2013): 50–5.
3. Jowell, P.S., Epstein, S., Fallon, M.D. "1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates glucocorticoid-induced alteration in serum bone GLA protein and bone histomorphometry." *Endocrinology* 120.2 (1987): 531–6.
4. Keck, K. "An ultramicro technique for the determination of deoxypentose nucleic acid." *Arch Biochem Biophys* 63 (1976): 446–51.
5. Olson, G.A., Olson, R.D., Kastin, A.J. "Endogenous opiates: 1993 (Review)." *Peptides* 15.8 (1994): 1513–56.
6. Noel, P., Nelson, S., Bokulic, R., et al. "Pentoxifyllin inhibits lipopolysaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality." *Life Sci* 47 (1990): 1023–29.

Следует также отметить, что возможным фактором, изменяющим условия обмена коллагена, может быть действие глюкокортикоидов [1], уровень которых, по-видимому, возрастает в связи с формированием воспалительного процесса.

Так, в работе P.S. Jowell и соавторов показано, что содержание в плазме крови костного глутаминового белка (BGP) – белка-маркера остеобластической активности и маркера формирования костной ткани значительно понижалось под влиянием ацетата кортизона [3]. При этом также происходило значительное снижение объема формируемой костной ткани, определявшегося по тетрациклиновой метке, что свидетельствует об уменьшении органического матрикса, в том числе коллагеновых волокон. Увеличение продукции эндогенных опиатов по интерлейкин-1-зависимому пути также обеспечивает снижение коллаген-синтетической функции фибробластов [5]. Поэтому можно полагать, что пентоксифиллин и никотинамид обеспечивают корригирующий эффект за счет блокирования высвобождения провоспалительных интерлейкинов – интерлейкина-1 $\beta$  и фактора некроза опухоли  $\alpha$  [6, 8].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о патогенетической роли нарушений обмена коллагена в ткани внутриматочной перегородки при привычном невынашивании беременности, что может послужить основанием для дальнейшего совершенствования патогенетически обоснованных методов лечения данной патологии.

## ВЫВОДЫ

1. В ткани внутриматочной перегородки у женщин, страдающих привычным невынашиванием беременности, отмечается увеличение синтеза коллагена.
2. Предоперационная подготовка женщин, включающая применение метилпреднизолона, пентоксифиллина и никотинамида, обеспечивает снижение синтеза коллагена в ткани внутриматочной перегородки.

7. Russell, J.E., Walker, W.V., Fenster, R.J. "In vitro evaluation of circadian patterns of bone collagen formation." *Proceed of Society for Exp Biol and Med* 180 (1985): 375–81.
8. Anderson, G.D., Peterson, T.C., Farin, F.M., et al. "The effect of nicotinamide on gene expression in a traumatic brain injury model." *Front Neurosci* 2 (2013). DOI: 10.3389/fnins.2013.00021
9. Carranza-Mamane, B., Havelock, J., Hemmings, R., et al. "The management of uterine fibroids in women with otherwise unexplained infertility." *J Obstet Gynecol Can* 37.3 (2015): 277–88.
10. Webster, D.F., Harvey, W. "Quantitative assay for collagen synthesis in microwell fibroblast cultures." *Anal Biochem* 96 (1979): 220–4. □

**ИЗМЕНЕНИЯ ОБМЕНА КОЛЛАГЕНА В ТКАНИ ВНУТРИМАТОЧНОЙ ПЕРЕГОРОДКИ У ЖЕНЩИН, СТРАДАЮЩИХ ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ**

**В.Н. Запорожан**, д. мед. н., академик НАМН Украины, ректор Одесского национального медицинского университета, профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 ОНМедУ

**В.И. Гладчук**, к. мед. н., аспирант кафедры акушерства и гинекологии № 1 ОНМедУ

**В.Г. Маричереда**, д. мед. н., проректор Одесского НМУ, профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 ОНМедУ

**Н.Н. Рожковская**, д. мед. н., профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 ОНМедУ

Формирование внутриматочной перегородки, являющееся следствием аномального эмбрионального развития, может быть связано с изменениями со стороны соединительной ткани, состояние которой обуславливает ее морфогенез. Поэтому целью данной работы было определение особенностей коллагенообразования в тканях, которые были получены при резекции внутриматочной перегородки. Дополнительной задачей исследования было изучение особенностей синтеза коллагена при применении в период дооперационной подготовки лечебного комплекса, включавшего метилпреднизолон, пентоксифиллин и никотинамид.

10 пациенток при отсутствии противопоказаний в течение 2 недель до операции получали препараты метилпреднизолон, пентоксифиллин и никотинамид. 10 пациенток не принимали указанный лечебный комплекс. В качестве контроля применяли ткань эндометрия 10 женщин, полученную при диагностической гистероскопии с ретроспективным диагнозом нормы.

При 120-минутной инкубации образцов ткани, полученной у пациенток, которым была сделана резекция полной внутриматочной перегородки с традиционной дооперационной подготовкой, регистрировалось увеличение включения  $^3\text{H}$ -пролина в сравнении с показателем в группе контроля в 2,2 раза. В то же время при инкубации образцов ткани пациенток, у которых в качестве предоперационной подготовки применяли метилпреднизолон (2 мг в день), пентоксифиллин (100 мг 3 раза в день) и никотинамид (10 мг 2 раза в день), включение  $^3\text{H}$ -пролина уменьшалось на 37,1% в сравнении с показателями в группе пациенток с традиционной дооперационной подготовкой. При этом данный показатель оставался на 60,0% выше, чем в группе контроля. Кроме того, под влиянием разработанного лечения отмечалось снижение количества вновь синтезированного коллагена – на 25,0% в сравнении с показателем у пациенток с традиционным лечением.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о патогенетической роли нарушений обмена коллагена в ткани внутриматочной перегородки при привычном невынашивании беременности. Предоперационная подготовка женщин, включающая применение метилпреднизолона, пентоксифиллина и никотинамида, обеспечивает снижение синтеза коллагена в ткани внутриматочной перегородки.

**Ключевые слова:** полная внутриматочная перегородка, привычное невынашивание, пролин, коллаген.

**ЗМІНИ ОБМІНУ КОЛАГЕНУ В ТКАНІНІ ВНУТРІШНЬОМАТКОВОЇ ПЕРЕТИНКИ В ЖІНОК, ЯКІ СТРАДАЮТЬ НА ЗВИЧНЕ НЕВИНОШУВАННЯ**

**В.М. Запорожан**, д. мед. н., академік НАМН України, ректор Одеського національного медичного університету, професор кафедри акушерства і гінекології № 1 ОНМедУ

**В.І. Гладчук**, к. мед. н., аспірант кафедри акушерства і гінекології № 1 ОНМедУ

**В.Г. Маричереда**, д. мед. н., проректор Одеського НМУ, професор кафедри акушерства і гінекології № 1 ОНМедУ

**Н.М. Рожковська**, д. мед. н., професор кафедри акушерства і гінекології № 1 ОНМедУ

Формування внутрішньоматкової перетинки, яке є наслідком аномального ембріонального розвитку, може бути пов'язано зі змінами з боку сполучної тканини, стан якої обумовлює її морфогенез. Тому метою даної роботи було визначення особливостей колагенотворення в тканинах, які були отримані під час резекції внутрішньоматкової перетинки. Додатковим завданням дослідження було вивчення особливостей синтезу колагену при застосуванні в період доопераційної підготовки лікувального комплексу, що включав метилпреднізолон, пентоксифілін та нікотинамід.

10 пацієнток за відсутності протипоказань протягом 2 тижнів до операції отримували препарати метилпреднізолон, пентоксифілін та нікотинамід. 10 пацієнток не приймали зазначений лікувальний комплекс. Як контроль застосовували тканину ендометрія 10 жінок, отриману під час діагностичної гістероскопії з ретроспективним діагнозом норми.

При 120-хвилинній інкубації зразків тканини, отриманої в пацієнток, яким було зроблено резекцію повної внутрішньоматкової перетинки з традиційною передопераційною підготовкою, реєструвалося збільшення включення  $^3\text{H}$ -проліну в порівнянні з показником групи контролю в 2,2 рази. Водночас при інкубації зразків тканини пацієнток, яким в період передопераційної підготовки застосовували метилпреднізолон (2 мг на день), пентоксифілін (100 мг 3 рази на день) та нікотинамід (10 мг 2 рази на день), включення  $^3\text{H}$ -проліну зменшувалося на 37,1% у порівнянні з показниками в групі пацієнток із традиційною передопераційною підготовкою. При цьому даний показник залишався на 60,0% вищим, ніж у групі контролю. Крім того, під впливом розробленого лікування відзначалося зниження кількості знову синтезованого колагену – на 25,0% у порівнянні з показником пацієнток із традиційним лікуванням.

Таким чином, отримані результати свідчать про патогенетичну роль порушень обміну колагену в тканині внутрішньоматкової перетинки при звичному невиношуванні вагітності. Передопераційна підготовка жінок, що включає застосування метилпреднізолону, пентоксифіліну і нікотинаміду, забезпечує зниження синтезу колагену в тканині внутрішньоматкової перетинки.

**Ключові слова:** повна внутрішньоматкова перетинка, звичне невиношування, пролін, колаген.

**COLLAGEN METABOLISM DETERIORATIONS IN INTRAUTERINE SEPTUM TISSUE OF WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSSES**

**V.M. Zaporozhan**, MD, Academician of the NAMS of Ukraine, Rector of Odesa National Medical University, professor at the Obstetrics and Gynaecology Department № 1, Odesa National Medical University

**V.I. Gladchuk**, PhD, postgraduate student at the Obstetrics and Gynaecology Department № 1, Odesa National Medical University

**V.G. Marichereda**, MD, Prorector of Odesa National Medical University, professor at the Obstetrics and Gynaecology Department № 1, Odesa National Medical University

**N.M. Rozhkovska**, MD, professor at the Obstetrics and Gynaecology Department № 1, Odesa National Medical University

Formation of an intrauterine septum caused by abnormal embryonic development may be due to changes of the connective tissue, which status causes tissue morphogenesis. Therefore, the aim of this work was to determine the characteristics of collagen in the tissues, which were obtained by resection of intrauterine septum. A further object of the research was to study the characteristics of the collagen synthesis when the therapeutic complex including methylprednisolone, pentoxifylline and nicotinamide is used at preoperative preparation.

10 patients in the absence of contraindications for 2 weeks before surgery received methylprednisolone, pentoxifylline and nicotinamide. 10 patients did not receive this medical complex. As a control, was used endometrial tissue of 10 women, resulting in diagnostic hysteroscopy with retrospective normal diagnosis.

When duration of incubation of tissue samples, which was got from traditionally treated women in the course of intrauterine septum resection, was 120 minutes, the level of  $^3\text{H}$ -proline inclusion increased by 2.2 times in comparison with the control. Similar incubation of the samples, which were derived from patients who were given complex treatment in preoperative period – methylprednisolone (2.0 mg/day), pentoxifylline (100 mg/thrice per day) and nicotinamide (10 mg twice per day) was resulted in the reduction of  $^3\text{H}$ -proline inclusion (by 37.1%) compared with the analogous index in traditionally treated patients. Nevertheless, this index continued to exceed such one in control group by 60.0%. Besides, proposed treatment induced the increase of the amount of newly synthesized collagen by 25.0% in comparison with traditionally treated patients.

Thus, the results indicate a pathogenetic role of collagen metabolism disorders in the intrauterine septum tissue during habitual miscarriage. Preoperative preparation including the use of methylprednisolone, pentoxifylline and nicotinamide, reduces the synthesis of collagen in the tissue of endometrial septum.

**Keywords:** full uterus septum, recurrent pregnancy losses, proline, collagen.