

ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВАГІНАЛЬНОГО ГЕЛЮ З РЕСВЕРАТРОЛОМ ТА ГІАЛУРОНОВОЮ КИСЛОТОЮ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГІПОЕСТРОГЕНОВОГО СТАНУ У ЩУРІВ

Стрига О. А. <https://orcid.org/0000-0002-9868-0264>
Зайченко Г. В. <https://orcid.org/0000-0002-3506-4800>
Савосько С.І. <https://orcid.org/0000-0001-5145-2195>
Сорокопуд К. Ю. <https://orcid.org/0000-0003-3448-7606>

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

stri.lena26@gmail.com

Актуальність. Менопаузальний період внаслідок необоротної втрати функції яєчників супроводжується різними клінічними симптомами та системними змінами. У свою чергу, замісна гормональна терапія має ряд протипоказів та побічних ефектів, тому наразі є необхідність пошуку та створення профілактичних та лікувальних засобів на основі природних сполук, які мають спорідненість до β -естрогенових рецепторів. Вагінальний гель з ресвератролом та гіалууроною кислотою здатний зменшити атрофічні прояви з боку слизової оболонки піхви та впливати на різноманітні симптоми періоду менопаузи. Однак характер впливу, дозування та наслідки тривалого застосування ресвератролу потребують подальшого вивчення.

Мета: вивчення фармакологічних властивостей нового вагінального гелю з ресвератролом і гіалууроною кислотою (ГК) на моделі гіпоестрогенії у оваріоектомованих щурів.

Матеріали та методи. Досліди проведені на 24 аутобредних білих нелінійних самках щурів, які були розподілені на 4 групи: інтактний контроль, контрольована патологія, контрольована патологія та введення ресвератролу з гіалууроною кислотою, контрольована патологія та введення препарату порівняння з синтетичним естрогеном. Ефективність препаратів оцінювали за їхнім впливом на вміст в крові статевих гормонів естрогену і прогестерону, на масу тіла, на температуру тіла, на рН вагінального секрету, на стан слизової оболонки піхви

Результати. Курсове 28-денне вагінальне введення гелю з ресвератролом та гіалууроною кислотою уповільнювало та нормалізувало приріст маси тіла оваріоектомованих самок щурів, стабілізувало температуру шкіри, сприяло нормалізації рН вагінального секрету піхви, нормалізувало рівень статевих гормонів в крові, сприяло відновленню епітеліальної пластинки піхви.

Висновки. Отримані результати показали доцільність розробки та використання нового вагінального гелю з ресвератролом та гіалууроною кислотою, як альтернативи гормонувмісним препаратам для профілактики або лікування патологічних гіпоестрогенових станів, що виникають на фоні дефіциту естрогенів.

Ключові слова: ресвератрол, фітоестрогенова активність, білатеральна оваріоектомія щурів, гіпоестрогеновий стан.

Актуальність. Менопауза – це природний біологічний процес, що характеризується припиненням менструації внаслідок необоротної втрати функції яєчників, включаючи овуляцію і продукцію естрогенів. Менопаузальні прояви супроводжуються різноманітними симптомами: вазомоторні симптоми, порушення сну, нервово-психічні порушення. Пізніше приєднуються генітоуринальні прояви, сексуальні розлади, зміни стану шкіри, серцево-судинні захворювання та інші, що погіршує якість життя жінки в період менопаузи [1].

Для корекції менопаузальних проявів призначають замісну гормональну терапію (ЗГТ), що ефективно зменшує патологічні прояви естрогендефіциту. Проте, препаратам цієї групи притаманна значна кількість побічних реакцій та протипоказань [2].

Враховуючи побічні реакції та протипоказання, є необхідність мінімізувати ризики та підвищити якість життя в менопаузальному періоді. Тому є необхідність пошуку та створення профілактичних та лікувальних засобів на основі природних спо-

лук, які мають спорідненість до β -естрогенових рецепторів. Увагу дослідників привертає, зокрема, ресвератрол.

Ресвератрол застосовують для фармакологічної корекції симптомів менопаузи [3]. Серед їх фармакологічних позитивних ефектів відзначають зниження частоти припливів [4, 5], корекцію сексуальних, генітоуринальних розладів [6] та вікових когнітивних дисфункцій [7, 8]. Ці засоби також використовують у посткліматеричному періоді з метою профілактики остеопорозу [9], ожиріння [10, 11], серцево-судинних захворювань, метаболічного синдрому та діабету 2 типу [12, 13], хіміопрофілактики раку молочної залози [11]. Свою ефективність фітоестрогени довели і при поширених у кліматеричному періоді дисфункціях тазового дна: при нетриманні сечі і калу, пролапсі органів малого тазу [14, 15].

Однак характер впливу, дозування та наслідки тривалого застосування фітоестрогенів, зокрема ресвератролу, потребують подальшого вивчення.

Мета: вивчення фармакологічних властивостей нового вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою (ГК) на моделі гіпоестрогенії у оваріоектомованих щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліди проведені на 24 аутбредних білих нелінійних самках щурів, масою 208-220 г. і віком 6-8 міс. Тварини були вирощені у розпліднику віварію НМУ імені О.О. Богомольця. Щури утримувались у стандартних умовах віварію: температура 20-25°C, відносна вологість 50-55%, природне освітлення, раціон, рекомендований для цих видів тварин, питний режим «ad libitum». При проведенні експериментів дотримувались «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985).

Тварин випадковим чином розподіляли на чотири експериментальні групи, в кожній з яких було по 6 самок: група 1 (n=6) – інтактний контроль (ІК); група 2 (n=6) – контрольна патологія (КП) – оваріоектомовані самки, у яких видаляли яєчники за методом Я.Д. Киршенבלата, під тіопенталовим наркозом в асептичних умовах; група 3 (n=6) – оваріоектомовані самки, які отримували 0,1 мл вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою (КП + гель з Р та ГК), група 4 (n=6) – оваріоектомовані самки, які отримували референтний препарат порівняння вагінальний крем «Колпотрофін», що містить синтетичний естроген проместрин (КП + крем з П) 0,1 мл. Оцінку ефективності досліджуваних тест-зразків проводили за мікроскопічним станом слизової оболонки вагіни та структурними змінами серця.

Через 5 тижнів після білатеральної оваріоектомії самкам упродовж 28 днів інтравагінально вводили вагінальний гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою та референтний препарат крем з проместрином.

Вагінальний гель, що досліджувався, був розроблений під керівництвом професора О.А. Рубан на кафедрі заводської технології НФаУ. Крім ресвератролу, що містить фітоестроген, до його складу входять гіалуронова кислота (ГК), яка сприяє синтезу колагену та амінокислот неструктурованого матриксу – головної речовини сполучної тканини слизових оболонок генітоуринального тракту, та молочна кислота, яка є важливою складовою вагінального середовища.

Як препарат порівняння, за показаннями до застосування, обрано вагінальний крем «Колпотрофін» (Нідерланди, серія: 6Н772). Крем містить синтетичний естроген – проместрин (П) дозою 10 мг/г.

Ефективність тест-зразків оцінювали за низкою показників. Масу тіла тварин вимірювали на протязі 28 днів, вранці натще на лабораторних електронних

вагах FEN-300 (AnD, Україна). Температуру шкіри біля кореня хвоста реєстрували в інтервалі з 09.00 до 10.00 щодня протягом 28 днів (термометр Thermo Tek Q5, Medical Indicators Inc). Цей показник вважають еквівалентом симптому «приливів жару» у жінок. Кислотність вагінального секрету рН вимірювали двічі: за 24 години до початку лікування та після 28-денного лікування, через 24 години після останнього введення тест-зразку або препарату порівняння. Показник рН вагінального секрету визначали за допомогою рН-тестів Citolab (DFI Co, Ltd, Корея). Вміст статевих гормонів (естрадіол, прогестерон) в сироватці крові самок щурів проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА) на імуноферментному аналізаторі Stat Fax 303 plus (Awareness Technology, США) із застосуванням стандартних наборів реактивів «Естрадіол ІФА» й «Прогестерон ІФА» (ТОВ «ХЕМА», Україна). Зразки піхви фіксували у 10%-розчині нейтрального формаліну (на фосфатному буфері, рН 7,4). З піхви отримували поперечні і поздовжні зрізи 2-3 мм і заливали у парафін (Leica Surgipath Paraplast Regular) через ізопропанол-парафіновий метод. Морфометричну оцінку проведено у пакеті програми Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1), для цього мікропрепарати досліджували і фотографували на мікроскопі Olympus BX 51. На мікрофотографіях з збільшенням об'єктиву $\times 20$, $\times 40$, які були одержані з однотипних ділянок досліджуваних зразків, вимірювали лінійні показники: у слизовій оболонці піхви – товщину епітеліальної пластинки (мкм).

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм Statistica 6.0, з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, парного двовибіркового t-тесту для середніх (динаміка зміни температури шкірних покривів). Значення рядів і їх середньоквадратичні помилки порівнювали між собою з визначенням коефіцієнта Стьюдента або Ньюмена-Кейлса – у випадку нормального розподілу, непараметричного критерію Крускала-Уолліса, Фішера – для даних, які не підкоряються нормальному закону розподілу. Статистичну морфологічну оцінку проведено у програмі Origin Lab version 8.0. Міжгрупові відмінності оцінювали за n критерієм Крускала-Уолліса, однофакторним ANOVA тестом. Дані наведено у вигляді медіани з кватильним розподілом (Me[Q1-Q3]) або середнього значення та похибки квадратичного відхилення (M \pm SE). Відмінності показників вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Патологічне збільшення маси тіла в період менопаузи є наслідком дефіциту та дисбалансу естрогенів і гестагенів в крові. Характерним метаболічним проявом менопаузального синдрому є порушення ліпідного обміну, що може грати важливу та вирішальну

роль у розвитку метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу. При клімактеричному синдромі динаміка маси тіла є непрямим підтвердженням релевантності моделі гіпоестрогенемії та ефективності тест-зразка впливати на цей симптом, який виникає внаслідок дисбалансу стероїдних гормонів у крові в менопаузальний період [16]. На початку експерименту всі тварини мали приблизно однакову масу тіла: від $208,67 \pm 1,82$ г до $218,00 \pm 1,63$ г (табл.1).

В групі ІК наприкінці 5 тижня експерименту відзначався незначний приріст маси тіла тварин, який склав 2,6%. У той же час, після моделювання гіпоестрогенового стану маса тіла оваріоектомованих щурів статистично достовірно збільшувалася до $249,67 \pm 2,25$ г, і приріст її перевищував такий у інтактних щурів в середньому на 11,57-14,57 %. Спостереження за оваріоектомованими самками щурів (6-9 тижнів) показало, що маса тіла в групі КП достовірно збільшилася в порівнянні з ІК, а приріст її становив 5,6 %. В групі КП + гель з Р та ГК та в групі КП + крем з П маса тіла тварин, яких лікували, була нижче ($p < 0,05$), ніж маса тварин в групі КП, а втрати жирової маси тканини складала в середньому 27,84 -29,17 г.

З початку експерименту на момент первинного зважування і до виведення щурів з експерименту (9-й тиждень) приріст маси тіла у самок щурів в групі КП

+ гель з Р та ГК був на 17,04% нижче, ніж в групі КП і достовірно не відрізнявся від значень препарату порівняння.

Це вказує на те, що при 28-денному курсовому введенні вагінальний гель, що містить фітоестроген ресвератрол, здатний уповільнити та нормалізувати приріст маси тіла у оваріоектомованих самок щурів. При цьому в групі тварин, яким в якості замісної гормонотерапії вводили крем з П, маса щурів практично наближалася до маси тіла здорових тварин. Як бачимо, жоден з досліджуваних препаратів не викликав збільшення маси оваріоектомованих щурів. Проте, найбільш ефективним засобом для нормалізації надмірної ваги при гіпоестрогенії виявилися вагінальний гель з ресвератролом.

Також до ранніх клімактеричних симптомів відносяться вазомоторні порушення, а саме припливи жару, нічна пітливість [17]. Жіночі статеві гормони впливають на всі органи, включаючи центральну нервову систему, кровоносні судини, серце, кістки, слизові оболонки піхви, сечовидільну систему, шкіру та ін. Для виявлення вазомоторних реакцій у тварин вимірювали температуру шкіри біля корення хвоста на протязі 4 тижнів (табл. 2).

На відміну від інтактних (здорових) тварин, у яких графік температури шкіри впродовж 4 тижнів

Таблиця 1

Динаміка змін маси тіла оваріоектомованих самок щурів до та після лікування

Група	Маса щурів до оваріоектомії, г	Маса через 5 тижнів після моделювання патології		Маса після 4 тижнів лікування (9 тижнів експерименту)		Приріст маси з початку експерименту, %
		Абс, г	Приріст, %	Абс, г	Приріст чи зниження, %	
ІК	$208,67 \pm 1,82$	$214,17 \pm 2,18$	2,6	$217,83 \pm 2,51$	1,74	4,55
КП	$211,33 \pm 1,15$	$246,33 \pm 1,19^*$	14,22	$260,17 \pm 1,92^*$	5,6	23
КП + гель з Р та ГК	$218,00 \pm 1,63$	$245,33 \pm 3,16^*$	11,15	$231,00 \pm 2,46^{*/\#}$	-5,84	5,96
КП + крем з П	$217,5 \pm 2,63$	$249,67 \pm 2,25^*$	12,9	$232,33 \pm 2,67^{*/\#/\&}$	-6,96	6,83

Примітки: * – достовірно відносно групи ІК ($p < 0,05$); # – достовірно відносно групи КП ($p < 0,05$); & – достовірно відносно групи КП + гель з Р та ГК ($p < 0,05$)

Таблиця 2

Динаміка температури тіла (t^0) у кореня хвоста оваріоектомованих самок до та після лікування

Група	t^0 до оваріоектомії, $^{\circ}\text{C}$	t^0 через 5 тижнів після моделювання патології		t^0 після 4 тижнів лікування (9 тижнів експерименту)		Підвищення t^0 з початку експерименту, %
		Абс, $^{\circ}\text{C}$	\uparrow , %	Абс, $^{\circ}\text{C}$	\uparrow чи \downarrow , %	
ІК	$32,83 \pm 0,14$	$32,92 \pm 0,05$	0,28	$32,94 \pm 0,11$	0,06	0,34
КП	$32,9 \pm 0,12$	$36,18 \pm 0,05^*$	9,1	$36,15 \pm 0,03^*$	-0,08	10
КП + гель з Р та ГК	$32,8 \pm 0,8$	$35,67 \pm 0,05^*$	8,2	$33,12 \pm 0,12^{\#}$	-7,2	1
КП + крем з П	$32,75 \pm 0,18$	$35,52 \pm 0,16^*$	7,9	$33,27 \pm 0,3^{\#}$	-6,42	1,6

Примітки: * – статистично достовірна різниця з групою ІК ($p < 0,05$); # – статистично достовірна різниця з групою КП ($p < 0,05$).

мав монотонний характер, коливаючись у межах від 32,70 до 32,94 °С, у оваріоектомованих самок (група КП) відмічено коливання температури до 36,18 °С на 5-й тиждень і до кінця експерименту, це свідчить про вазомоторні реакції, які кваліфікували, як рівнозначні «приливам жару».

В групах оваріоектомованих самок щурів, яким проводили лікування вагінальним гелем з ресвератролом та гіалууроною кислотою, температура тіла не відрізнялася від норми, $t = 33,120$ С, що свідчить про нормалізацію термогеруляції на фоні курсового лікування. Також при введенні крему з промєстрином температура коливалась в межах норми, $t = 33,270$ С. Цей показник статистично достовірно відрізнявся від значень температури у оваріоектомованих самок щурів з групи КП ($p < 0,05$). Підбиваючи підсумки, можна припустити, що дія фітоестрогенів у досліджувальному гелі з Р та ГК була пов'язана зі здатністю зменшувати вивільнення гормонів, таких як ТТГ (тіреотропний гормон) та ЛГ (лютеїнізуючий гормон), які відіграють ключову та важливу роль у патогенезі «приливів жару» в клімактеричному періоді [18].

Під час менопаузи в жіночому організмі зменшується кількість вироблення жіночих статевих гормонів. Такі гормональні перебудови зменшують кількість секрету, і зникає поживне середовище для лактобактерій, внаслідок чого зростає рН вагінального секрету піхви. В цей період жінки відчувають сухість у піхві, подразнення, а рівень рН (в нормі 4,0-4,5) підвищується до 6,5-7,0. Лужне середовище стоншує слизову оболонку піхви, викликає сухість, з'являються мікротріщинки і ймовірність зараження різними інфекціями, що приводить до симптомів атрофічного вагініту та дискомфорту під час статевого контакту, знижується якість життя.

У зв'язку з цим вивчався вплив досліджувального тест-зразка на показник рН вагінального секрету у самок щурів з гіпоестрогенією (рис. 1).

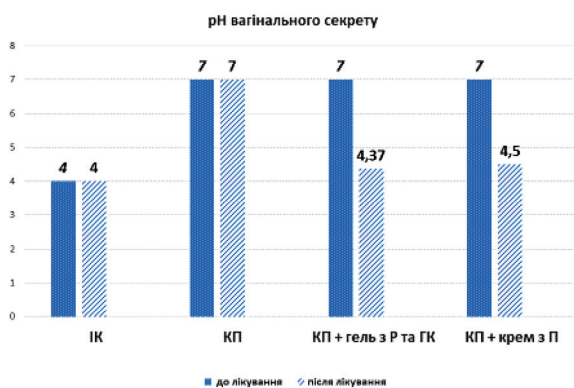


Рис. 1. Значення рН вагінального секрету у самок щурів.

Примітки: перші стовпчики в парах – вихідні значення рН; другі стовпчики – значення рН після 28-денного курсу лікування.

Через 5 тижнів після проведеної операції оваріоектомії самки щурів були поділені на групи, між якими перед початком лікування не було відзначено різниці в показниках рН. При вимірюванні рН вагінальних змивів встановлено, що у самок щурів показник рН збільшився з 4,0 до 7,0, тобто кислотність вагінального секрету зменшувалася (рис. 1). При гіпофункції яєчників зменшується синтез естрогенів. Естрогени збільшують вміст глікогену, який активує розростання багатошарового епітелію, а відлущені клітини епітелію є субстратом для ферментів життєдіяльності лактобактерій, які, в свою чергу, утворюють молочну кислоту, що є основним механізмом дії формування кислотності вагінального середовища.

Після лікування кислотність вагінального секрету вимірювали вдруге. Таким чином, встановлено, що значення рН вагінального секрету в групах самок щурів зі збереженими і видаленими яєчниками не змінилася, залишилася на відмітках 4,0 і 7,0, відповідно (рис. 1).

Курсове 28-денне лікування оваріоектомованих самок вагінальним гелем з ресвератролом та гіалууроною кислотою позитивно впливало на стан слизової оболонки піхви, зокрема призводило до відновлення фізіологічного діапазону значень кислотності вагінального секрету (показник рН знижується до фізіологічних значень, а саме 4,37-4,5). Цей показник статистично достовірно відрізнявся від показника у нелікованих тварин КП. Після лікування оваріоектомованих самок щурів кремом з промєстрином спостерігалася нормалізація рН вагінального секрету, і цей показник майже відповідав даним групи ІК.

Таким чином, даний досліджувальний вагінальний гель з ресвератролом та гіалууроною кислотою сприяв зниженню та нормалізації рН до показника, який характеризував середу вагінального секрету, як кислу, і не поступався при цьому препарату порівняння крему з промєстрином.

Найбільш характерні зміни, які спостерігаються після хірургічного видалення яєчників, стосуються рівня статевих гормонів – естрадіолу та прогестерону в крові.

Період менопаузи є нормальним фізіологічним процесом та характеризується зниженням синтезу і секреції статевих стероїдних гормонів. Рівень естрогену і прогестерону впливають на всі органи і системи жіночого організму та є «мішенями» при гіпоестрогеновому стані.

Вміст статевих гормонів (естрадіол, прогестерон) в сироватці крові самок щурів проводили імуноферментним методом. Результати ІФА продемонстрували статистично достовірне зниження рівня гормонів на фоні двосторонньої оваріоектомії, а саме: рівня естрадіолу – в 2 рази, а прогестерону – в 2,8 рази, відносно даних групи ІК, що напряду пов'язано з оперативним втручанням і різким зниженням стероїдних гормонів.

Таблиця 3

Вміст статевих гормонів у сироватці крові оваріоектомованих самок щурів

Група	Рівень естрадіолу, пг/мл	Рівень прогестерону, пг/мл
ІК	46,7±0,6	23,3±0,3
КП	23,07±0,3*	8,3±0,2*
КП + гель з Р та ГК	35,45±0,8*/#	12,1±0,3*/#
КП + крем з П	39,5±0,8*/#/ε	15,9±0,4*/#/ε

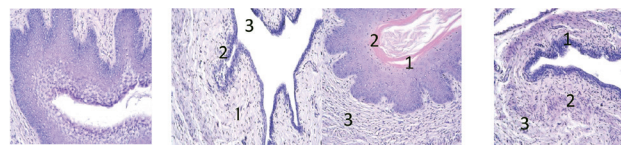
Примітки: * – статистично достовірна різниця з даними групи ІК ($p < 0,05$); # – статистично достовірна різниця з даними групи КП ($p < 0,05$); ε – статистично достовірна різниця з даними групи КП + гель з Р та ГК ($p < 0,05$);

Курсове вагінальне введення гелю з ресвератролом та гіалуриновою кислотою помірно впливало на рівень статевих гормонів. Вміст естрадіолу в сироватці крові тварин цієї групи хоча і був в 1,5 рази вище ($p < 0,05$), ніж у самок щурів групи КП, але все ж таки не досягав значень ІК. Аналогічно, спостерігалось зростання рівня прогестерону, який у 1,4 рази ($p < 0,05$) перевищував показник у нелікованих оваріоектомованих самок і так само не досягав рівня інтактних тварин. Рівень естрадіолу в сироватці крові самок, які отримували крем з проместрином, вірогідно не відрізнявся від даних інтактною групи тварин, тоді як рівень прогестерону був у 1,5 разів меншим, ніж у самок ІК. Отримані результати свідчать, що жодний препарат не здатний цілком відновити гормональний фон у сироватці крові експериментальних тварин. Препарат порівняння корегував стан гіпоестрогенемії, але слабо впливав на рівень прогестерону. Особливої уваги заслуговує те, що застосування вагінального гелю з Р та ГК майже нормалізувало рівень естрадіолу та прогестерону в порівнянні з КП.

З метою об'єктивної оцінки лікувальної дії було доцільним дослідити вплив тест-зразків на мікро- та макроскопічний стан тканин слизової оболонки піхви самок щурів з гіпоестрогенемією.

Гістоструктура піхви самок щурів групи ІК відповідала видовій нормі, а саме: стінка піхви складалася з трьох оболонок: внутрішньої, середньої м'язової оболонки (власна пластинка слизової оболонки – строма) та зовнішньої сполучнотканинної оболонки. Епітеліальна пластинка характеризувалась достатньою товщиною епітеліальної пластинки (в середньому 200-400 мкм) та складалася з багат шарового незроговілого епітелію, з чіткою морфофункціональною диференціацією на базальний, проміжний та поверхневий шари (рис. 2). На морфологічному рівні представлена власна пластинка – пухкою сполучною тканиною, яка вростає у епітеліальну пластину у вигляді сосочків. Вона містить поодинокі кровоносні

капіляри, фібробласти та макрофаги (особливо на межі з епітеліальною пластинкою). У сполучній тканині реєстрували кровоносні судини (поодинокі гемоканіляри). Морфологічних ознак запального процесу, крововиливів або дистрофічних змін епітеліальної пластинки слизової оболонки піхви не відмічалось. Десквамація епітелію та помірна інфільтрація макрофагів у зразках відповідала фізіологічному стану слизової оболонки піхви [19].



а-ІК б-КП в-гель з Р та ГК г- крем з П

Рис. 2. Морфологічний і гістологічний стан епітеліальної пластинки піхви:

а – інтактних самок (фізіологічний стан); б – самок групи КП, 35 доба після оваріоектомії (різке зменшення товщини епітеліальної пластинки, як прояв атрофічних змін епітелію слизової оболонки піхви); в – самок групи КП + гель з Р та ГК (виражені відновні процеси епітеліальної пластинки слизової оболонки піхви, регенерація епітелію); г – самок групи КП+ крем з П (активація відновного процесу, атрофічні прояви епітеліальної пластинки).

Примітки: 1 – просвіт піхви; 2 – епітеліальна пластинка; 3 – власна пластинка слизової оболонки. Гематоксилін-еозин, об. 20, ок. 10.

Таблиця 4

Морфометрична оцінка стану слизової оболонки піхви оваріоектомованих самок щурів

Група	Товщина епітеліальної пластинки, мкм; Me [Q1-Q3]
ІК	183,2 [129,9 – 244,6]
КП	39,4 [33,5 – 52,3]*
КП + гель з Р та ГК	173,1 [141,1 – 215,9]#
КП + крем з П	95,4 [75,1 – 112,6]#

Примітки: * – достовірно по відношенню до групи тварин ІК, $p < 0,05$. # – достовірно по відношенню до групи тварин КП, $p < 0,05$;

У всіх шести зразках піхв самок щурів групи КП морфологічна картина характеризувалася різким зменшенням товщини епітеліальної пластинки (в середньому дорівнювало 39,4 мкм). Цей показник був суттєво меншим у порівнянні з тваринами групи ІК (рис. 2, табл. 4). Товщина епітеліальної пластинки неоднорідна, в ділянках реєстрували поодинокі клітини на стадії мітозу, але також частіше виявляли клітини у стані каріопікнозу, що є цитологічною ознакою їх загибелі. Стан сполучної тканини мав деяку відмінність: від незміненої морфології до збільшення щільності фібробластів. Збільшення фібробластів може бути пов'язано з явищами ремоделювання міжклітинного матриксу на фоні атрофічних проявів та поєднанням з початковими запальними процесами (реєстрували появу нейтрофілів, макрофагів та еозинофілів

у сполучній тканині). Сосочки власної пластинки були слабо виражені або взагалі відсутні. На основі морфологічних та морфометричних досліджень зроблено висновок про розвиток, який свідчить про атрофічні зміни слизової оболонки піхви (головним чином епітеліальної пластинки) після оваріоектомії у всіх досліджених зразках тварин групи КП.

Таким чином, після оваріоектомії зменшення кількості ендогенних естрогенів призводило до змін в нижньому відділі генітального тракту самок щурів.

При курсовому уведенні тест-зразка з Р та ГК спостерігалися ознаки типової естрогеноподібної дії, регенеративних процесів та підвищення функціонального стану (секретоутворення) слизової оболонки вагіни.

У зразках епітелій характеризувався відновленням проміжного і функціонального шару, але останній піддавався кератинізації, чого у інтактних щурів не реєстрували. У просвіті піхви виявлено десквамовані, кератинізовані епітеліоцити. У власній пластинці піхви встановлено часткове відновлення рельєфу сосочків, проте їх морфологічні ознаки не досягали інтактного стану. У 4 зразках у пухкій сполучній тканині було зареєстровано рясну інфільтрацію еозинофілів. Це було оцінено як прояв імунної реакції на лікування вагінальним гелем з фітоестрогеном. За результатами морфометрії, виявлено відновлення товщини епітеліальної пластинки (в середньому від 173,1 мкм).

Грунтуючись на результатах статистичних даних морфометричного аналізу зроблено висновок про відновлення стану епітеліальної пластинки піхви порівняно з нелікованими тваринами. Статистично значущої різниці з показником самок щурів групи ІК не виявлено, але морфофункціональний стан епітеліальної та власної пластинки піхви самок щурів все ще не досягав остаточного відновлення.

Результати дослідження показників щурів дослідної групи, яким вводили крем з промєстрином наведені на рисунку 2-г та у таблиці 4. Гістологічна картина стану слизової оболонки піхви свідчила, що товщина епітеліальної пластинки була стоншеною у порівнянні з групою інтактних тварин. Морфофункціональний стан слизової оболонки піхви самок свідчив про збереження атрофічних змін епітеліальної пластинки (товщина в середньому становила 95,4 мкм), збільшенням шарів епітеліоцитів (відновлення проміжного шару), частковим відновленням рельєфу сосочків власної пластинки. Такі зміни оцінено, як незначні прояви регенеративних процесів під дією референтного засобу. Проте, відновлення слизової оболонки до стану інтактних тварин не виявлено в жодному з досліджених зразків.

Лікування тест-зразком вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою більш виражено усувало атрофічні прояви в слизовій оболонці піхви, стимулювало відновні процеси, що наближало стан слизової оболонки вагіни самок до тварин групи ІК.

Ми вважаємо, що отримані результати показали доцільність подальшої розробки та використання нового вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, як альтернативи гормонівмісним препаратам, для профілактики або лікування патологічних гіпоестрогенових станів, що виникають на фоні дефіциту естрогенів. Адже період менопаузи – новий фізіологічний етап життя та здоров'я жінки. А підтримка рівня статевих гормонів у жінок в менопаузальному періоді і адекватна терапія в значній мірі знижують ризик небажаних наслідків.

ВИСНОВКИ

1. У самок щурів після білатеральної оваріоектомії відмічено зростання маси тіла, коливання температури шкіри біля кореня хвоста, збільшення показника рН вагінального секрету піхви та атрофічні прояви слизової оболонки піхви, що відповідає клінічним проявам клімактеричного синдрому.
2. Курсове 28-денне вагінальне введення гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою оваріоектованим самкам щурів уповільнювало та нормалізувало приріст маси тіла, стабілізувало температуру шкіри та сприяло нормалізації рН вагінального секрету піхви.
3. Ресвератрол в складі вагінального гелю нормалізував в крові кастрованих самок рівень естрогену та прогестерону.
4. Вагінальний гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою сприяв відновленню стану епітеліальної пластинки вагіни оваріоектованим тварин, при цьому ефективність цього гелю перевершувала дію препарату порівняння.

REFERENCES

1. Zeleke BM, Bell RJ, Billah B, Davis SR. Vasomotor and sexual symptoms in older Australian women: a cross-sectional study. *Fertil Steril*. 2016 Jan; 105 (1):149-55.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.017. View at: Publisher Site: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(15\)01934-2/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(15)01934-2/fulltext) Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0015028215019342> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26450529/> Europe PMC: <http://europepmc.org/article/med/26450529>
2. Yan F, Robert M, Li Y. Statistical methods and common problems in medical or biomedical science research. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2017 Nov 1; 9 (5) : 157-63. View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29209453/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5698693/>
3. Rietjens I, Louisse J, Beekmann K. The potential health

- effects of dietary phytoestrogens. *Br J Pharmacol*. 2017 Jun; 174 (11): 1263-80. DOI: 10.1111/bph.13622
View at: Publisher Site: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bph.13622>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27723080/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5429336/>
4. Daily JW, Ko B-S, Ryuk J, Liu M, Zhang W, Park S. Equol Decreases Hot Flashes in Postmenopausal Women: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J Med Food*. 2019 Feb; 22 (2): 127-39. DOI: 10.1089/jmf.2018.4265
View at: Publisher Site: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2018.4265>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30592686/>
 5. Chen M-N, Lin C-C, Liu C-F. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. *Climacteric*. 2015 Apr; 18 (2): 260-9. DOI: 10.3109/13697137.2014.966241.
View at: Publisher Site: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13697137.2014.966241>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25263312/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4389700/>
 6. Najafi MN, Ghazanfarpour M. Effect of phytoestrogens on sexual function in menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Climacteric*. 2018 Oct; 21 (5): 437-45. DOI: 10.1080/13697137.2018.1472566.
View at: Publisher Site: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13697137.2018.1472566?journalCode=icmt20>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30156931/>
 7. Alwerdt J, Patterson AD, Sliwinski MJ. Gender Differences in Phytoestrogens and the Relationship with Speed of Processing in Older Adults: A Cross-Sectional Analysis of NHANES, 1999-2002. *Nutrients*. 2019 Aug; 11(8): 1780. DOI: 10.3390/nu11081780
View at: Publisher Site: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/8/1780>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31374973/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6723727/>
 8. Evans HM., Howe PRC, Wong RHX. Effects of Resveratrol on Cognitive Performance, Mood and Cerebrovascular Function in Post-Menopausal Women; A 14-Week Randomised Placebo-Controlled Intervention Trial. *Nutrients*. 2017 Jan; 9(1): 27. DOI: 10.3390/nu9010027
View at: Publisher Site: <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/1/27>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28054939/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5295071/>
 9. Bo S, Gambino R, Ponzio V, Cioffi I, Goitre I, Evangelista A, Ciccone G, Cassader M, Procopio M. Effects of resveratrol on bone health in type 2 diabetic patients. A double-blind randomized-controlled trial. *Nutr Diabetes*. 2018 Sep 20; 8(1): 51. DOI: 10.1038/s41387-018-0059-4
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/s41387-018-0059-4>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30237505/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6147949/>
 10. Hall JM, Powell HR, Rajic L et al. The Role of Dietary Phytoestrogens and the Nuclear Receptor PPAR γ in Adipogenesis: An in Vitro Study. *Environ Health Perspect*. 2019 Mar; 127(3): 037007. DOI: 10.1289/EHP3444
View at: Publisher Site: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/EHP3444>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30920877/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6768326/>
 11. Rossi EL, Khatib SA, Doerstling SS, Bowers LW, Pruski M, Ford NA, Glickman RD, Niu M, Yang P, Cui Z, DiGiovanni J, Hursting SD. Resveratrol inhibits obesity-associated adipose tissue dysfunction and tumor growth in a mouse model of postmenopausal claudin-low breast cancer. *Mol Carcinog*. 2018 Mar; 57 (3): 393-407. DOI: 10.1002/mc.22763
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mc.22763>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29197120/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6053655/>
 12. Glisic M, Kastrati N, Gonzalez-Jaramillo V, Bramer WM, Ahmadizar F, Chowdhury R, Danser AJ, Roks AJ, Voortman T, Franco OH, Muka T. Associations between Phytoestrogens, Glucose Homeostasis, and Risk of Diabetes in Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr*. 2018 Nov; 9 (6): 726-40. DOI: 10.1093/advances/nmy048
View at: Publisher Site: <https://academic.oup.com/advances/article/9/6/726/5194328>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30462180/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6247339/>
 13. Li Y, Huang J, Yan Y, Liang J, Liang Q, Lu Y, Zhao L, Li H. Preventative effects of resveratrol and estradiol on streptozotocin-induced diabetes in ovariectomized mice and the related mechanisms. *PLoS One*. 2018; 13 (10): e0204499. DOI: 10.1371/journal.pone.0204499
View at: Publisher Site: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0204499>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30273360/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6166971/>
 14. Cardenas-Trowers O, Meyer I, Markland AD, Richter HE, Addis I. A Review of Phytoestrogens and Their Association with Pelvic Floor Conditions. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*. 2018 May-Jun; 24 (3): 193-202. DOI: 10.1097/SPV.0000000000000559
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/fpmrs/Abstract/2018/05000/A_Review_of_Phytoestrogens_and_Their_Association.1.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29432329/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>

- articles/PMC5920717/
15. Cardenas-Trowers O, Meyer I, Richter HE, Addis I, Markland AD. Association of Urinary Phytoestrogens with Pelvic Organ Prolapse and Fecal Incontinence Symptoms in Post-menopausal Women. *Female Pelvic Med Reconstr Surg.* 2019 Mar-Apr; 25 (2): 161-6. DOI: 10.1097/SPV.0000000000000661
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/fp-mrs/Abstract/2019/03000/Association_of_Urinary_Phytoestrogens_With_Pelvic.17.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30807421/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6504965/>
16. Al-Safi ZA, Polotsky AJ. Obesity and Menopause. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2015 May; 29(4): 548-53. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2014.12.002
View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521693414002582?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25579233/>
17. Sorokina A. [Alternative methods for correcting menopausal disorders]. *Doctor.* 2019; (9): 51-8. [In Russian]. DOI: 10.29296/25877305-2019-09-17
View at: Publisher Site: <https://vrachjournal.ru/25877305-2019-09-17>
18. Morrow P.K., Mattair D.N., Hortobagyi G.N. Hot flashes: a review of pathophysiology and treatment modalities. *Oncologist.* 2011; 16(11): 1658-64. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0174
View at: Publisher Site: <https://theoncologist.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1634/theoncologist.2011-0174>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22042786/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3233302/>
19. Zaichenko GV, Striga OA, Mironenko OI, Ivanyuk OI [Pharmacological substantiation of the choice of the optimal composition of a new vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid]. *Pharmacology and drug toxicology* 2020; 14(6): 397-412. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.33250/14.06.397>
View at: Publisher Site: <https://www.pharmtox-j.org.ua/index.php/pharmtox-j/article/view/95>

Article history
Received: 07.03.2021
Revision requested: 13.03.2021
Revision received: 26.03.2021
Accepted: 29.03.2021
Published: 31.03.2021

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВАГИНАЛЬНОГО ГЕЛЯ С РЕСВЕРАТРОЛОМ И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИПОЭСТРОГЕНОВОГО СОСТОЯНИЯ У КРЫС

Стрига О.А., Зайченко А.В., Савосько С.И., Сорокопуд Е.Ю.

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев, Украина

stri.lena26@gmail.com

Актуальность. Менопаузальный период вследствие необратимой потери функции яичников сопровождается различными клиническими симптомами и системными изменениями. В свою очередь, заместительная гормональная терапия имеет ряд противопоказаний и побочных эффектов, поэтому существует необходимость поиска и создания профилактических и лечебных средств на основе природных соединений, которые имеют сходство к β -эстрогеновым рецепторам. Вагинальный гель с ресвератролом и гиалуроновой кислотой способен уменьшить атрофические проявления со стороны слизистой оболочки влагалища и влиять на различные симптомы периода менопаузы. Однако характер влияния, дозировка и последствия длительного применения ресвератрола требуют дальнейшего изучения.

Цель: изучение фармакологических свойств нового вагинального геля с ресвератролом и гиалуроновой кислотой (ГК) на модели гипозэстрогении у овариоэктомированных крыс.

Материалы и методы. Опыты проводились на 24 аутобредных белых нелинейных самках крыс, которые были распределены на 4 группы: интактный контроль, контролируемая патология, контролируемая патология и введение ресвератрола с гиалуроновой кислотой, контролируемая патология и введение препарата сравнения с синтетическим эстрогеном. Эффективность препаратов оценивали по их влиянию на содержание в крови половых гормонов эстрогена и прогестерона, на массу тела, на температуру тела, на pH вагинального секрета, на состояние слизистой оболочки влагалища.

Результаты: курсовое 28-дневное вагинальное введение геля с ресвератролом и гиалуроновой кислотой замедляло и нормализовало прирост массы тела овариоэктомированных самок крыс, стабилизировало температуру тела, способствовало нормализации pH вагинального секрета, нормализовало уровень половых гормонов в крови, способствовало восстановлению эпителиальной пластинки влагалища.

Выводы: полученные результаты показали целесообразность разработки и использования нового вагинального геля с ресвератролом и гиалуроновой кислотой, как альтернативы гормональным препаратам для профилактики и/или лечения патологических гипозэстрогеновых состояний, возникающих на фоне дефицита эстрогенов.

Ключевые слова: ресвератрол; фитоэстрогеновая активность; билатеральная овариоэктомия крыс; гипозэстрогеновое состояние.

THE INVESTIGATION OF PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF VAGINAL GEL WITH RESVERATROL AND HYALURONIC ACID IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL HYPOESTROGENIC STATE IN RATS

Stryha O.A., Zaychenko G.V., Savosko S.I., Sorokopud K.Y.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

stri.lena26@gmail.com

Relevance. The menopausal period due to irreversible loss of ovarian function is accompanied by various clinical symptoms and systemic changes. In turn, hormone replacement therapy has a number of contraindications and side effects, so now there is a need to find and create prophylactic and therapeutic agents based on natural compounds that are related to β -estrogen receptors. Vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid can reduce atrophic manifestations of the vaginal mucosa and affect various symptoms of menopause. However, the nature of the effect, dosage and consequences of long-term use of resveratrol need further study.

Objective: to study pharmacological properties of a new vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid (HA) in a model of hypoestrogenism in ovariectomized rats.

Materials and methods. The experiments were performed on 24 outbred white nonlinear female rats, which were divided into 4 groups: intact control, controlled pathology, controlled pathology and administration of resveratrol with hyaluronic acid, controlled pathology and administration of a comparison drug with synthetic estrogen. The effectiveness of the drugs was assessed by their effect on the blood levels of the sex hormones estrogen and progesterone, on body weight, on body temperature, on the pH of vaginal secretions, on the state of the vaginal mucosa..

Results. 28-day vaginal injection of gel with resveratrol and hyaluronic acid slowed down and normalized weight gain of ovariectomized female rats, stabilized skin temperature and induced normalization of the pH of vaginal secretions of the vagina, normalized the level of sex hormones in the blood, promoted the restoration of the epithelial plate of the vagina.

Conclusions. The results showed the feasibility of developing and using a new vaginal gel with resveratrol as an alternative to hormone-containing drugs for the prevention or treatment of pathological hypoestrogenic conditions arising from estrogen deficiency.

Key words: resveratrol; phytoestrogenic activity; bilateral ovariectomy of rats; hypoestrogenic state.